

File 351:Derwent WPI 1963-2003/UD,UM &UP=200361
(c) 2003 Thomson Derwent

1/3,AB/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

007618014

WPI Acc No: 1988-251946/198836

Related WPI Acc No: 1997-131281

XRAM Acc No: C88-112320

XRPX Acc No: N88-191625

**Sepg poly-nucleotide from soln. by binding to polycationic support -
which does not retain smaller sequences, esp. for hybridisation assays**

Patent Assignee: GEN-PROBE INC (GENP-N); ARNOLD L J (ARNO-I); LYLE J A
(LYLE-I)

Inventor: ARNOLD L J; NELSON N C; REYNOLDS M A; WALDROP A A; LYLE J A

Number of Countries: 022 Number of Patents: 014

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 281390	A	19880907	EP 88301839	A	19880302	198836 B
WO 8806633	A	19880907	WO 88US550	A	19880302	198838
AU 8814269	A	19880926				198851
NO 8804847	A	19890206				198911
PT 86881	A	19890330				198916
DK 8806075	A	19881228				198918
FI 8805022	A	19881101				198931
JP 1502319	W	19890817	JP 88502502	A	19880302	198939
EP 281390	B1	19940622	EP 88301839	A	19880302	199424
DE 3850273	G	19940728	DE 3850273	A	19880302	199429
			EP 88301839	A	19880302	
ES 2054797	T3	19940816	EP 88301839	A	19880302	199434
CA 1339446	C	19970909	CA 560293	A	19880302	199749
KR 9600479	B1	19960108	WO 88US550	A	19880302	199905
			KR 88701387	A	19881102	
JP 2862547	B2	19990303	JP 88502502	A	19880302	199914
			WO 88US550	A	19880302	

Priority Applications (No Type Date): US 8720866 A 19870302

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

EP 281390 A E 30

Designated States (Regional): BE CH DE DK ES FI FR GB GR IT LI LU NL SE

WO 8806633 A E

Designated States (National): AU DK FI JP KR NO US

EP 281390 B1 E 43 C07H-001/06

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

DE 3850273 G C07H-001/06 Based on patent EP 281390

ES 2054797 T3 C07H-001/06 Based on patent EP 281390

JP 2862547 B2 29 C12Q-001/68 Previous Publ. patent JP 1502319

Based on patent WO 8806633

CA 1339446 C C07H-021/00

KR 9600479 B1 C12Q-001/68

Abstract (Basic): EP 281390 A

Nucleotide multimers (A), present together with contaminants (B) in
a soln., are purified by treating with a polycationic solid support (I)

to non-covalently bind (A) but not (B). The (A)-loaded support is then sepd. and opt. treated to recover (A), esp. by elution.

The solid support is a metal oxide, glass, polyamide, polyester, polyolefin, polysaccharide, polyglycol or polyamino-acid, with positive charges introduced from alkyl- or aryl-amines, guanidines or imines. It can be in the form of particles, fibres or membranes, opt. magnetic to facilitate sepn.

The test soln. is reacted with a labelled nucleotide probe for the target sequence, forming a hybrid. The reaction mixt. is incubated with (I) so that hybrids are retained, but not unhybridised probe. The solid and liq. phases are sepd. and the solid, pref. after washing, examined for presence of the probe. The solid can also be eluted to release the labelled probe, esp. with 50% formamide, phosphate, pyrophosphate, tripolyphosphate and phytic acid as eluant. (A) should be at least 3 (esp. 5) times larger than the probe (which is e.g. a methyl phosphonate analogue of RNA and DNA). The probe has a lower negative charge in its backbone than the phosphate diesters of natural RNA or DNA. In a less pref. variant, polynucleotides being tested are reacted with (I) first, then incubated with the probe.

USE/ADVANTAGE - The method is esp. used in assays for specific nucleotide sequences (in soln. or in polynucleotides) by hybridisation. It provides rapid purificn./sepn. from complex solns., based on the fact that larger(A) bind more tightly to (A) than short sequences.

Dwg.0/0

Abstract (Equivalent): EP 281390 B

A method for purifying a polynucleotide which is present in a solution containing an oligonucleotide which is smaller than the polynucleotide comprising: (a) contacting the solution with a solid support, said solid support having a plurality of cations available to interact with anions on the polynucleotide under conditions which binds said polynucleotide to said solid support but which are insufficient to bind said oligonucleotide to said solid support; wherein said solid support is capable of separating polynucleotides according to their charge or length and is: a magnetic amine solid support; a magnetic propylamine solid support; a magnetic quaternary ammonium solid support; a magnetic poly-D-lysine functionalised solid support; a poly-D-lysine functionalised polyurethane solid support; a spermine latex solid support; a Tris (2-amino ethyl) amine latex solid support; a Tris (2-amino ethyl) amine beaded agarose solid support; or a Tris (2-aminoethyl) polyurethane solid support; and (b) separating said oligonucleotide from said solid support while said polynucleotide is held to said solid support.

(Dwg.0/0)

⑫ 公表特許公報(A)

平1-502319

⑬ 公表 平成1年(1989)8月17日

⑭ Int. Cl.⁴
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/50

識別記号 庁内整理番号
A-6807-4B
P-7055-2C

審査請求 未請求
予備審査請求 未請求

部門(区分) 1(1)

(全33頁)

⑯ 発明の名称 核酸精製、分離及びハイブリダイゼーション用ポリカチオン性支持体

⑰ 特 願 昭63-502502
⑱ 出 願 昭63(1988)3月2日

⑲ 翻訳文提出日 昭63(1988)11月2日
⑳ 国際出願 PCT/US88/00550
㉑ 国際公開番号 WO88/06633
㉒ 国際公開日 昭63(1988)9月7日

優先権主張 ㉓ 1987年3月2日 ㉔ 米国(US) ㉕ 020,866

⑳ 発 明 者 アーノルド、ライル・ジョン・ ジュニア アメリカ合衆国、カリフォルニア・92117、サン・ディエゴ、ノウ
㉑ 出 願 人 アーノルド、ライル・ジョン・ ジュニア アメリカ合衆国、カリフォルニア・92117、サン・ディエゴ、ノウ
㉒ 出 願 人 ネルソン、ノーマン・チャールズ アメリカ合衆国、カリフォルニア・92111、サン・ディエゴ、マー
㉓ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外2名 レスタ・ドライブ・3639
㉔ 指 定 国 AU, DK, FI, JP, KR, NO, US
最終頁に続く

請求の範囲

1. 汚染物を含有する溶液中でヌクレオチドマルチマーを精製する方法であって、
 - a. 溶液をポリカチオン性固体支持体に接触させ、汚染物を適度に結合させることなくマルチマーを支持体に非共有的に結合させる段階と、
 - b. 支持体及び結合したマルチマーを溶液から分離する段階と
 を含むことを特徴とする前記方法。
2. マルチマーを回収するように支持体进行处理することを特徴とする請求項1に記載の方法。
3. 支持体を溶離溶液で処理してマルチマーを脱着した後、溶離溶液を分離し、次いで固体支持体を分離することを特徴とする請求項2に記載の方法。
4. 溶離溶液がリン酸塩、ピロリン酸塩、トリポリリン酸塩、フィテン酸及び50%ホルムアミドから構成される群の一員であることを特徴とする請求項3に記載の方法。
5. 溶離溶液からマルチマーを回収することを特徴とする請求項3に記載の方法。
6. 溶離溶液からマルチマーを回収することを特徴とする

請求項4に記載の方法。

7. 汚染物を含有する溶液からの分離後に固体支持体を洗浄することとを特徴とする請求項1、2、3、4、5又は6に記載の方法。
8. マルチマー及び汚染物を含有する溶液が分離溶液であることを特徴とする請求項7に記載の方法。
9. マルチマーがポリヌクレオチドであることを特徴とする請求項1、2、3、4、5又は6に記載の方法。
10. 汚染物が結合したポリヌクレオチドよりも小さいヌクレオチドマルチマーを含んでいることを特徴とする請求項9に記載の方法。
11. 固体支持体が粒子から構成されることを特徴とする請求項1、2、3、4、5又は6に記載の方法。
12. 固体支持体がミクロン寸法の粒子から構成されることを特徴とする請求項11に記載の方法。
13. 固体支持体が繊維から構成されることを特徴とする請求項1、2、3、4、5又は6に記載の方法。
14. 固体支持体が膜であることを特徴とする請求項1、2、3、4、5又は6に記載の方法。
15. 固体支持体が電気反応性粒子から構成され、分離が磁

場を加えることにより助長されることを特徴とする請求項12に記載の方法。

16. 固体支持体がミクロン寸法の電気反応性繊維から精成され、分離が磁場を加えることにより助長されることを特徴とする請求項13に記載の方法。

17. 繊維が電気反応性であり、分離が磁場を加えることにより助長されることを特徴とする請求項14に記載の方法。

18. カチオン電荷がアルキルもしくはアリールアミン、グアニジン又はイミンにより付与されることを特徴とする請求項1、2、3、4、5又は6に記載の方法。

19. 固体支持体が金属酸化物、ガラス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン、多糖、ポリグリコール又はポリアミノ酸であることを特徴とする請求項18に記載の方法。

20. 試験溶液中で標的ヌクレオチド配列を検出するためのアッセイであって、

a. 試験溶液中で標識化ヌクレオチドアプローブと該標的とのハイブリッドを形成するハイブリダイジング条件下で、標的配列用の標識化ヌクレオチドアプローブを該試験溶液と接触させる段階と、

b. ポリカチオン性固体支持体を該試験溶液に接触させ、結

るためのアッセイであって、

a. 標的配列が存在する場合にアプローブと標的配列とのハイブリッドを形成するハイブリダイジング条件下で、アッセイされるポリヌクレオチドよりも小さいヌクレオチドマルチマーである標的配列用のヌクレオチドアプローブを、標的配列を含んでいる長いあるポリヌクレオチドを含む溶液に加える段階と、

b. 溶液中の、アプローブとのハイブリッドを含むポリヌクレオチド及びハイブリダイズしていないアプローブをポリカチオン性固体支持体と一緒にさせ、ハイブリダイズしていないアプローブを適度に関合させることなくポリヌクレオチド及びハイブリッドをアプローブと非共有的に結合させる段階と、

c. ハイブリダイズしていないアプローブを含む溶液から固体支持体を分離する段階と、

d. 支持体に結合したポリヌクレオチド中の標的配列の存在及び／又は量の指標として固体支持体に結合したアプローブの存在を検出する段階と

を含むことを特徴とする前記アッセイ。

23. ポリヌクレオチド中の標的ヌクレオチド配列を検出す

るためのアッセイであって、

a. 試験溶液中で該標的の定性又は定量的尺度として該結合相又は該遊離相を検出する段階と

を含むことを特徴とする前記アッセイ。

21. ポリヌクレオチド中の標的ヌクレオチド配列を検出するためのアッセイであって、

a. 標的配列が存在する場合にアプローブと該標的配列とのハイブリッドを形成するハイブリダイジング条件下で、標的配列を含んでいる長いあるポリヌクレオチドを含む溶液に標的配列用のヌクレオチドアプローブを加える段階と、

b. 溶液中の、アプローブとのハイブリッドを含むポリヌクレオチド及びハイブリダイズしていないアプローブをポリカチオン性固体支持体と一緒にさせる段階と、

c. ハイブリダイズしていないアプローブを含む溶液から固体支持体を分離する段階と、

d. 該試験溶液中の標的ポリヌクレオチド配列の定量又は定性的尺度として固体支持体に結合していないアプローブ又は結合しているアプローブの存在を検出する段階と

を含むことを特徴とする前記アッセイ。

22. ポリヌクレオチド中の標的ヌクレオチド配列を検出す

るためのアッセイであって、

a. 標的配列が存在する場合にアプローブと標的配列とのハイブリッドを形成するハイブリダイジング条件下で、標的配列を含む長いあるポリヌクレオチドを含む溶液に標的配列用のヌクレオチドアプローブを加える段階と、

b. 溶液中の、アプローブとのハイブリッドを含むポリヌクレオチド及びハイブリダイズしていないアプローブをポリカチオン性固体支持体と一緒にさせる段階と、

c. ハイブリダイズしていないアプローブを含む溶液から固体支持体を分離する段階と、

d. 溶解溶液を使用して固体支持体からハイブリッド、標識化アプローブ又は標識を溶解させる段階と、

e. 該試験溶液中の標的ポリヌクレオチド配列の定量又は定性的尺度として固体支持体に結合していないアプローブ又は結合しているアプローブの存在を検出する段階と

を含むことを特徴とする前記アッセイ。

24. ハイブリッド溶解液が50%ホルムアミド、リン酸塩、ピロリン酸塩、トリポリリン酸塩及びフィチン酸から構成される群の一員であることを特徴とする請求項23に記載の方法。

25. プローブされるポリヌクレオチドがプローブの少なくとも約3倍の大きさのマルチマーであることを特徴とする請求項22に記載の方法。

26. プローブされるポリヌクレオチドがプローブの少なくとも約5倍の大きさのマルチマーであることを特徴とする請求項22に記載の方法。

27. プローブが天然のDNA又はRNAのリン酸ジエステルよりも低い負の電荷をリン酸塩主鎖に有するDNA又はRNAのアナログであることを特徴とする請求項20、21、22又は23に記載の方法。

28. アナログがメチルホスホネートであることを特徴とする請求項27に記載の方法。

29. 固体支持体の分離が、ハイブリダイズしていないプローブを含む溶液から固体支持体を除去する段階を含むことを特徴とする請求項20、21、22又は23に記載の方法。

30. プローブが天然のDNA又はRNAのリン酸ジエステルよりも低い負の電荷をリン酸塩主鎖に有するDNA又はRNAのアナログであり、固体支持体の分離が、ハイブリダイズしていないプローブを含む溶液から固体支持体を除去する段階を含むことを特徴とする請求項20、21、22又は23に記載の方法。

38. 固体支持体が膜であることを特徴とする請求項20、21、22又は23に記載の方法。

39. 固体支持体が磁気反応性粒子から構成され、分離が該粒子に磁場を加えることにより得られることを特徴とする請求項36に記載の方法。

40. 固体支持体が磁気反応性繊維から構成され、分離が該繊維に磁場を加えることにより得られることを特徴とする請求項37に記載の方法。

41. 固体支持体が磁気反応性膜であり、分離が該膜に磁場を加えることにより得られることを特徴とする請求項38に記載の方法。

42. カチオン電荷がアルキルもしくはアリールアミン、グアニジン又はイミンにより付与されることを特徴とする請求項20、21、22又は23に記載の方法。

43. 固体支持体の分離が、ハイブリダイズしていないプローブを含む溶液から固体支持体を除去する段階を含むことを特徴とする請求項42に記載の方法。

44. 固体支持体がミクロン寸法の粒子から構成されることを特徴とする請求項43に記載の方法。

45. 固体支持体が繊維から成されることを特徴とする請求項43に記載の方法。

法。

31. プローブが天然のDNA又はRNAのリン酸ジエステルよりも低い負の電荷をリン酸塩主鎖に有するDNA又はRNAのアナログであり、固体支持体の分離がハイブリダイズしていないプローブを含む溶液から固体支持体を除去する段階を含んでおり、プローブがその検出を可能にする標識を有していることを特徴とする請求項20、21、22又は23に記載の方法。

32. プローブの検出に先立って固体支持体を洗浄することを特徴とする請求項30に記載の方法。

33. プローブの検出に先立って固体支持体を洗浄することを特徴とする請求項31に記載の方法。

34. プローブがその検出を可能にする標識を有していることを特徴とする請求項20、21、22又は23に記載の方法。

35. 固体支持体から粒子から構成されることを特徴とする請求項20、21、22又は23に記載の方法。

36. 固体支持体がミクロン寸法の粒子から構成されることを特徴とする請求項35に記載の方法。

37. 固体支持体が繊維から構成されることを特徴とする請求項20、21、22又は23に記載の方法。

請求項43に記載の方法。

46. 固体支持体が膜であることを特徴とする請求項43に記載の方法。

47. 粒子が磁気反応性であり、分離が該粒子に磁場を加えることにより得られることを特徴とする請求項44に記載の方法。

48. 繊維が磁気反応性であり、分離が該粒子に磁場を加えることにより得られることを特徴とする請求項45に記載の方法。

49. 膜が磁気反応性であり、分離が該粒子に磁場を加えることにより得られることを特徴とする請求項46に記載の方法。

50. 粒子が金属酸化物、ガラス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン、多糖、ポリグリコール又はポリアミノ酸であることを特徴とする請求項47に記載の方法。

51. 繊維が金属酸化物、ガラス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン、多糖、ポリグリコール又はポリアミノ酸であることを特徴とする請求項48に記載の方法。

52. 膜が金属酸化物、ガラス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン、多糖、ポリグリコール又はポリアミノ酸

であることを特徴とする請求項49に記載の方法。

53. ポリヌクレオチド中の標的ヌクレオチド配列を検出するためのアッセイであって、

a. 標的配列を含んでいる疑いのあるポリヌクレオチドを含む溶液をポリカチオン性固体支持体に接触させ、ポリヌクレオチドを固体支持体に非共有的に結合させる段階と、

b. 標的配列が存在する場合にプローブと標的配列とのハイブリッドを形成するハイブリダイジング条件下で、ハイブリダイズしていないプローブを固体支持体に過度に結合させることなく、アッセイされるポリヌクレオチドよりも小さいヌクレオチドマルチマーである標的配列用のヌクレオチドプローブを含む溶液に、固体支持体及び結合したポリヌクレオチドを接触させる段階と、

c. ハイブリダイズしていないプローブを含む溶液から固体支持体を分離する段階と、

d. ポリヌクレオチド中の標的配列の尺度としてハイブリッドの存在を定性又は定量的に検出する段階と

を含むことを特徴とする前記アッセイ。

54. ポリヌクレオチド中の標的ヌクレオチド配列を検出するためのアッセイであって、

55. プローブされるポリヌクレオチドがプローブの少なくとも約5倍の大きさのマルチマーであることを特徴とする請求項53又は54に記載の方法。

57. プローブが天然のDNA又はRNAのリン酸ジエステルよりも低い負の電荷をリン酸基主鎖に有するDNA又はRNAのアナログであることを特徴とする請求項53又は54に記載の方法。

58. アナログがメチルホスホネートであることを特徴とする請求項53に記載の方法。

59. アナログがメチルホスホネートであることを特徴とする請求項54に記載の方法。

60. 固体支持体の分離がハイブリダイズしていないプローブを含む溶液から固体支持体を除去する段階を含んでいることを特徴とする請求項58に記載の方法。

61. 固体支持体の分離がハイブリダイズしていないプローブを含む溶液から固体支持体を除去する段階を含んでおり、アナログがメチルホスホネートであることを特徴とする請求項58に記載の方法。

62. プローブの検出に先立って固体支持体を洗浄することを特徴とする請求項60に記載の方法。

63. プローブの検出に先立って固体支持体を洗浄すること

a. 標的配列を含んでいる疑いのあるポリヌクレオチドを含む溶液をポリカチオン性固体支持体に接触させ、ポリヌクレオチドを固体支持体に非共有的に結合させる段階と、

b. 標的配列が存在する場合にプローブと標的配列とのハイブリッドを形成するハイブリダイジング条件下で、ハイブリダイズしていないプローブを固体支持体に過度に結合させることなく、アッセイされるポリヌクレオチドよりも小さいヌクレオチドマルチマーである標的配列用のヌクレオチドプローブを含む溶液に、固体支持体及び結合したポリヌクレオチドを接触させる段階と、

c. ハイブリダイズしていないプローブを含む溶液から固体支持体を分離する段階と、

d. 溶液溶液を使用して固体支持体からハイブリッド、標的化プローブ又は標的を分離させる段階と、

e. ポリヌクレオチド中の標的配列の尺度としてハイブリッドの存在を定性又は定量的に検出する段階と

を含むことを特徴とするアッセイ。

55. プローブされるポリヌクレオチドがプローブの少なくとも約8倍の大きさのマルチマーであることを特徴とする請求項53又は54に記載の方法。

を特徴とする請求項51に記載の方法。

64. プローブがその検出を可能にする標的を有していることを特徴とする請求項53又は54に記載の方法。

65. 固体支持体が粒子から構成されることを特徴とする請求項53又は54に記載の方法。

66. 固体支持体がミクロン寸法の粒子から構成されることを特徴とする請求項65に記載の方法。

67. 固体支持体が繊維から構成されることを特徴とする請求項53又は54に記載の方法。

68. 固体支持体が膜であることを特徴とする請求項53又は54に記載の方法。

69. 固体支持体が磁気反応性粒子から構成され、分離が該粒子に磁場を加えることにより得られることを特徴とする請求項68に記載の方法。

70. 固体支持体が磁気反応性粒子から構成され、分離が該粒子に磁場を加えることにより得られることを特徴とする請求項67に記載の方法。

71. 固体支持体が磁気反応性粒子であり、分離が該粒子に磁場を加えることにより得られることを特徴とする請求項68に記載の方法。

72. カチオン電荷がアルキルもしくはアリールアミン、グアニジン又はイミンにより付与されることを特徴とする請求項53又は54に記載の方法。

73. 固体支持体の分離が、ハイブリダイズしていないアロップを含む溶液から固体支持体を除去する段階を含むことを特徴とする請求項72に記載の方法。

74. 固体支持体がミクロン寸法の粒子から構成されることを特徴とする請求項72に記載の方法。

75. 固体支持体が繊維から構成されることを特徴とする請求項72に記載の方法。

76. 固体支持体が膜であることを特徴とする請求項72に記載の方法。

77. 粒子が磁気反応性であり、分離が該粒子に磁場を加えることにより得られることを特徴とする請求項74に記載の方法。

78. 繊維が磁気反応性であり、分離が該繊維に磁場を加えることにより得られることを特徴とする請求項75に記載の方法。

79. 膜が磁気反応性であり、分離が該膜に磁場を加えることにより得られることを特徴とする請求項76に記載の方法。

b. ポリヌクレオチドの電荷又は長さに従ってポリヌクレオチドを分離することが可能なポリカチオン性支持体と、

c. ハイブリッド溶液溶液とから構成されることを特徴とする前記キット。

85. 標的配列を含む疑いのあるポリヌクレオチドを含む溶液中で標的ヌクレオチド配列をアッセイするためのキットであって、

a. アッセイされるポリヌクレオチドよりも小さいヌクレオチドマルチマーである標的配列用のヌクレオチドアロップと、

b. ハイブリダイズしていないアロップを過度に結合させることなくポリヌクレオチド及びそのアロップとのハイブリッドを非共有的に結合させることが可能なポリカチオン性支持体と

から構成されることを特徴とする前記キット。

86. 標的配列を含む疑いのあるポリヌクレオチドを含む溶液中で標的ヌクレオチド配列をアッセイするためのキットであって、

a. アッセイされるポリヌクレオチドよりも小さいヌクレオチドマルチマーである標的配列用のヌクレオチドアロップ

80. 粒子が金属鹽化物、ガラス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン、多糖、ポリグリコール又はポリアミノ酸であることを特徴とする請求項77に記載の方法。

81. 繊維が金属鹽化物、ガラス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン、多糖、ポリグリコール又はポリアミノ酸であることを特徴とする請求項78に記載の方法。

82. 膜が金属鹽化物、ガラス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン、多糖、ポリグリコール又はポリアミノ酸であることを特徴とする請求項79に記載の方法。

83. 標的配列を含む疑いのあるポリヌクレオチドを含む溶液中で標的ヌクレオチド配列をアッセイするためのキットであって、

a. 標的配列用のヌクレオチドアロップと、

b. ポリヌクレオチドの電荷又は長さに従ってポリヌクレオチドを分離することが可能なポリカチオン性支持体とから構成されることを特徴とする前記キット。

84. 標的配列を含む疑いのあるポリヌクレオチドを含む溶液中で標的ヌクレオチド配列をアッセイするためのキットであって、

a. 標的配列用のヌクレオチドアロップと、

と、

b. ハイブリダイズしていないアロップを過度に結合させることなくポリヌクレオチド及びそのアロップとのハイブリッドを非共有的に結合させることが可能なポリカチオン性支持体と、

c. ハイブリッド溶液溶液と

から構成されることを特徴とする前記キット。

87. ハイブリッド溶液溶液が50%ホルムアミド、リン酸塩、ピロリン酸塩、トリポリリン酸塩及びフィチン酸から構成される群の一員であることを特徴とする請求項84又は86に記載のキット。

88. アロップされるポリヌクレオチドがアロップの少なくとも約3倍の大きさとなるようにアロップを選択することを特徴とする請求項85に記載のキット。

89. アロップされるポリヌクレオチドがアロップの少なくとも約5倍の大きさであることを特徴とする請求項85に記載のキット。

90. アロップが天然のDNA又はRNAのリン酸ジエステルよりも低い負の電荷をリン酸塩主鎖に有するDNA又はRNAのアナログであることを特徴とする請求項82又は84又は85又は86

に記載のキット。

91. アナログがメチルホスホネートであることを特徴とする請求項80に記載のキット。

92. プローブがその検出を可能にする装置を有していることを特徴とする請求項83又は84又は85又は86に記載のキット。

93. 固体支持体が粒子から構成されることを特徴とする請求項83又は84又は85又は86に記載のキット。

94. 固体支持体がミクロン寸法の粒子から構成されることを特徴とする請求項93に記載のキット。

95. 固体支持体が繊維から構成されることを特徴とする請求項83又は84又は85又は86に記載のキット。

96. 固体支持体が膜であることを特徴とする請求項83又は84又は85又は86に記載のキット。

97. 粒子が磁気反応性であることを特徴とする請求項94に記載のキット。

98. 繊維が磁気反応性であることを特徴とする請求項95に記載のキット。

99. 膜が磁気反応性であることを特徴とする請求項96に記載のキット。

ミノ酸であることを特徴とする請求項104に記載のキット。

100. 膜が金属酸化物、ガラス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン、多糖、ポリグリコール又はポリアミノ酸であることを特徴とする請求項105に記載のキット。

100. カチオン電荷がアルキルもしくはアリアルアミン、グアニジン又はイミンにより付与されることを特徴とする請求項83又は84又は85又は86に記載のキット。

101. 固体支持体が粒子から構成されることを特徴とする請求項100に記載のキット。

102. 固体支持体が繊維から構成されることを特徴とする請求項100に記載のキット。

103. 固体支持体が膜であることを特徴とする請求項100に記載のキット。

104. 粒子が磁気反応性であることを特徴とする請求項101に記載のキット。

105. 粒子が磁気反応性であることを特徴とする請求項102に記載のキット。

106. 粒子が磁気反応性であることを特徴とする請求項103に記載のキット。

107. 粒子が金属酸化物、ガラス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン、多糖、ポリグリコール又はポリアミノ酸であることを特徴とする請求項108に記載のキット。

108. 繊維が金属酸化物、ガラス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン、多糖、ポリグリコール又はポリア

明 細 書

核酸精製、分離及びハイブリダイゼーション用ポリカチオン性支持体

1. 産業上の利用分野

本発明はポリカチオン性支持体、及び核酸を精製し、ハイブリダイゼーション手順のために核酸を固定化し、ハイブリダイズしていないより小さいポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドプローブを過度に除去することなく比較的大きいハイブリダイズしたポリヌクレオチドを溶液から選択的に分離するための該支持体の使用に係る。

2. 従来技術の説明

近年、ポリヌクレオチドを精製し、ハイブリダイゼーション反応を利用してポリヌクレオチド中の特異的なヌクレオチド配列を検出したいという要求は非常に高まっている。このために、ポリヌクレオチド及びそのハイブリッドを分離し、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドプローブを使用してポリヌクレオチド中の特異的な領域のヌクレオチド配列を検出するべく多くの方法が開発されている。

ポリヌクレオチド精製分野では、ハイブリダイゼーションに先立ってポリヌクレオチドを精製するか、あるいは固

々の生化学的手順に抵触し得る生物汚染物を除去する方法が使用されている。歴史的には、フェノール抽出、エタノール沈降、ゲル電気泳動、ゲル浸透のような各種の方法が使用されている(Shib & Martin, *Biochemistry*, **13**:3411-3418 [1974]; Enes & Zinder, *Science*, **190**:584-588 [1975]; Shin & Khoury, *Biochemistry*, **15**:487-498, [1976]; Longacre & Mack, *J. Biol. Chem.*, **253**:7500-7507 [1978]; Goldberg他, *Methods in Enzymol.*, **68**:208-242 [1979]; Kreis他, *Analytical Biochem.*, **124**:288-294 [1983]; 及び Gautreau他, *Analytical Biochem.*, **134**:320-324 [1983])。

より最近では、一重鎖及び二重鎖ポリヌクレオチドの分離用精製に高压液体クロマトグラフィが使用されている。この方法で使用されるアニオン交換カラムとしては、RPC-5(Pearson他, *Biochem. Biophys. Acta*, **228**, 770-774, [1974])、Kel-fを含む他の被覆支持体(Shim及び Crosters, *Nucl. Acids Res.*, **5**, 2297-2311, [1978])又はケイ酸ガラスビード(Karibara他, *J. Chromatog.*, **238**, 513-518, [1982])、及びNucleoson(西ドイツDurenに所在のMacherey-Nagelの登録商標)のようなジエチルアミノエチル誘導シ

リカ(Colpan及びRiesner, *J. Chromatog.*, **228**, 339-353, [1984]; Becker他, *J. Chromatog.*, **226**, 251-261, [1985])並びにMøller, *Eur. J. Biochem.*, **155**, 203-212, [1986])がある。

更に、別の最近の精製方法としては、特殊な支持体の表面へのポリヌクレオチドの選択的吸着(Johnson他, *Biochemistry*, **4**, 64-70 [1988]; Guenther他, *Fed. Proc.*, **44**, 1622 (abs. 7088) [1985])、及び相補的核酸配列によるポリヌクレオチドの固定化(Masibhusan & Crothers, *Eur. Pat. App. No.* 130, 523 [1985]; Rutb他, *Fed. Proc.*, **44**, 1622 (abs. 7088), 1985; Blakesley及びThompson, *Int. Pat. App. No.* PCT/US84/00508 [1985])の両方がある。

しかしながら、上記精製方法は特に臨床環境に適応させる場合、以下に示すような1つ以上の制限がある。即ち、これらの方法は時間と労力がかかり、所望のポリヌクレオチドを定量的に回収することができず、臨床サンプルに適合せず、自動化システムとのインターフェースが容易でないなどの欠点がある。

ポリヌクレオチドの精製以外には、ポリヌクレオチド及

びヌクレオチドプローブのハイブリッドをハイブリダイズしていないポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドプローブから分離するために固体支持体を使用されている。適当に標識されたポリマーヌクレオチドプローブを使用するポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、非反復又は決して発現されたポリヌクレオチド標的配列を検出するための確実で且つ高感度の方法であるとして長い間認められている。この能力により、細菌、ウイルス、寄生虫及び菌類のような感染性生物、鎌状赤血球貧血のような遺伝的疾患、及び各種の癌を検出することができる。しかしながら、ハイブリダイズしたポリヌクレオチドをハイブリダイズしていないポリヌクレオチドから迅速且つ簡単に分離することができないため、臨床診断におけるハイブリダイゼーション手順の使用及び調査環境は制限されている。

20年以上にわたり、ハイブリダイゼーションを使用して「標的」ポリヌクレオチドの存在を確認するための方法を開発するべく研究者は努力を重ねている。これらの方法の大部分は、ハイブリダイズしていないポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドプローブ分子からのポリヌクレオチドハイブリッドの分離に基づいている。1988年及び1984年に、

Nygaard & Hall(*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **12**, 98 [1983]; *J. Mol. Biol.*, **9**, 125 [1984])は、ニトロセルロースで透過することによりDNA/RNAハイブリッドを分離する方法を報告している。これらの研究者は、一重鎖及び二重鎖RNAはニトロセルロースに固着しないが、一重鎖DNA又はRNAと複合したDNAはニトロセルロースに固着することを見出した。こうして、フィルタ上に捕えられた放射性量の量を測定することにより、放射性物質で標識したRNAと標識しないDNAとの間の反応を監視することができた。

この方法に従ってGillespie及びSpiegelman(*J. Mol. Biol.*, **12**, 829 [1965])は、一重鎖DNAをニトロセルロースフィルタに固定し、放射性物質で標識したRNAを含む溶液とハイブリダイズさせる方法を報告している。過剰のRNAを除去後、フィルタに固定した放射性標識の量によりハイブリダイゼーションの程度を決定した。

翌年、Denhardt(*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 641 [1966])は、一重鎖DNAをニトロセルロースに固定し、フィルタに「キャップ」をして非特異的なバックグラウンドを減少させ、固定化DNAを放射性物質で標識した適当なDNAプローブを含む溶液とハイブリダイズさせる同様のシステ

ムの開発を促している。このシステムは、今日でもなお好適なハイブリダイゼーション手順のひとつである。しかしながら、この方法は労力及び時間がかかり、一般に丸一日以上必要である。

ニトロセルロースの他には、ヒドロキシアパタイトが一重鎖及び二重鎖ポリヌクレオチドを分離するために使用されている。例えば、Britten及びKohne(Carnegie Inst., Washington Yearbook, **85**, 78 [1986])はハイブリダイズした³²Pで標識した大腸菌DNAフラグメントをハイブリダイズしていない大腸菌DNAフラグメントから分離するためにヒドロキシアパタイトを使用している。これらの方法はBrenner他(Anal. Biochem., **28**, 447 [1969])により更に改良され、試験管内で分離を実施するように改良された。

ハイブリダイゼーション反応のためにDNA及びRNAの固定化を更に改良するべく、別の方法も開発されている。これらの方法には、塩化シアヌルで活性化した紙(Banger他,Biochem. Biophys. Acta, **953**, 344 [1981])及びアリアルジアゾニウムセルロース紙(Seed, Mol. Acids Res., **10**, 1788 [1982])にDNA及びRNAを固定する方法がある。

ニトロセルロースに固定したDNA又はRNAにハイブリダイ

ズした放射性物質以外で標識したデオキシリボ核酸プローブを可視化する方法も記載されている(Larry他,Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **80**, 4045 [1983])。しかしながら、この方法は別途の「キャッピング」及び洗浄段階が必要であるので、放射性標識を使用する従来のプロトコルよりも更に労力がかかる。

ハイブリダイゼーションを使用する「標的」ポリヌクレオチドの検出を改良するべく、二重(サンドイッチ)ハイブリダイゼーションを使用する多数の方法が開発されている。固定化ポリヌクレオチドを使用して標的ポリヌクレオチドを検出した後、標識した第2のポリヌクレオチドとハイブリダイズさせる方法が一般的である(Dunn & Sambrook, Methods. Enzymol., **85**, 468-478 [1980]; Palva, Journal. Clin. Micro., **18**, 92-100 [1983]; Virtanen他, Lancet, **381-383** [1983]; Ranki他, Gene, **21**, 77-85 [1983]; Ranki & Soderlund, U.S.P.N. 4,486,599 [1984]; Polak & Czekin他, Clin. Chem., **31**, 1438-1443 [1985]; Ranki & Soderlund U.S.P.N. 4,563,419 [1986])。

サンドイッチアッセイ法の一例によると、溶液中で両方のハイブリダイゼーション反応を行った後、固定化ストレ

プトビオジン上で分離し、ビオチンで標識したプローブを使用して完全なポリヌクレオチドサンドイッチを分離する(Bansen & Jones, E.P.O. 0 139 489 [1985])。

上記ハイブリダイゼーションシステムは、臨床環境で広く有用なハイブリダイゼーションアッセイ手順を実施するためにはまだ操作の容易さ及び処理速度が不足している。これらのシステムは一般に時間及び労力がかかり、感度が低い。更に、これらの方法の多くは生物サンプル中に含まれる物質(agents)と不適合であり、迅速に自動化できない。

3. 用語の定義

本文中に使用される用語の定義を以下に述べる。

ヌクレオチド: リン酸基、五炭糖及び窒素含有基から構成される核酸のサブユニット。RNAでは五炭糖はリボースである。DNAでは2-デオキシリボースである。

ヌクレオチドマルチマー: ホスホジエステル結合により結合したヌクレオチド鎖。

オリゴヌクレオチド: 一般に約10〜約100個のヌクレオチド長を有し、場合によっては200個以上のヌクレオチド長を有し得るヌクレオチドマルチマー。通常はヌクレオチドモノマーから合成されるかあるいは酵素的手段により得ら

れる。

ポリヌクレオチド: 一般に約100個以上のヌクレオチド長を有するヌクレオチドマルチマー。

ヌクレオチドプローブ: 通常は診断的意味を有するポリヌクレオチドである第2のヌクレオチドマルチマーに含まれる標的核酸配列と相補的なヌクレオチド配列を有するヌクレオチドマルチマー。通常、プローブは標的配列と完全に相補的になるように選択される。しかしながら、場合によってはプローブ中の1個以上のヌクレオチドは標的配列中の対応する塩基に相補的でなくてもよく、あるいはそのほうが望ましい場合もある。ヌクレオチドプローブは同じく通常は標的配列を含むマルチマーよりも小さいマルチマーである。典型的にはオリゴヌクレオチドであるが、ポリヌクレオチドでもよく、通常、例えば放射性分析、比色分析、蛍光分析、化学発光又は他の適当な方法により検出し得る化学的置換基で標識されている。

分離液: 通常はポリヌクレオチド、又はそのハイブリッドであるヌクレオチドマルチマーを、場合によってはより小さいポリヌクレオチド及びオリゴヌクレオチドを含む汚染物と結合することなく本発明のカチオン性固体支持体に

固定化させる組成を有する溶液。プローブとハイブリダイズしたポリヌクレオチドが固定化されているとき、分離溶液はヌクレオチドプローブを支持体に結合させないという付加的な性を有する。

洗浄溶液: 通常はポリヌクレオチド又は所望のポリヌクレオチドハイブリッドである所望のヌクレオチドマルチマーを、本発明のカチオン性固体支持体から過度に除去することなく過剰のヌクレオチドプローブ又は汚染物を除去するような組成を有する溶液。洗浄溶液の組成は、場合によっては分離溶液と同一でもよい。

洗脱溶液: ポリヌクレオチド、ハイブリダイズしたポリヌクレオチドのようなヌクレオチドマルチマー、又は標識化ヌクレオチドプローブ、又は特異的標識をカチオン性固体支持体から遊離させるように構成された溶液であって、特定の遊離は固体支持体から回収したい種類に依存する。

ハイブリダイゼーション溶液: 所望のハイブリダイゼーションを生じさせるように構成された溶液。所望のハイブリダイゼーションは典型的にはポリヌクレオチドと標識配列のプローブとの間に行われる。従って、先にカチオン性固体支持体に固定化したポリヌクレオチドとの間にハイブリダ

される。固体支持体を溶液から分離後、マルチマーは支持体から遊離され得る。

より短い標識化ヌクレオチドプローブで比較的長いポリヌクレオチドを検出するハイブリダイゼーション手順で有用な本発明の別の方法によると、ポリヌクレオチド及びプローブとのそのハイブリッドをハイブリダイズしていないプローブから分離するためにポリカチオン性支持体を使用され得る。この方法の好適態様によると、ポリヌクレオチドを含む溶液にプローブを加え、固定前にハイブリダイゼーションを生じさせる。プローブとのハイブリダイゼーション後、溶液を支持体と接触させ、プローブとのハイブリッドを含むポリヌクレオチドを吸着させる。あまり好適でない態様によると、ポリヌクレオチドを含む溶液にポリカチオン性支持体を加え、プローブを加える前にポリヌクレオチドを支持体表面に吸着させる。この場合、ハイブリダイゼーションは支持体表面で生じる。どちらの態様でも、支持体のカチオン性表面と負電荷を有するポリヌクレオチド主鎖との間の相互作用を介して、比較的長いポリヌクレオチドが支持体に結合する。ポリヌクレオチドに結合しなかったプローブ分子は支持体に結合せず、溶液中に止どまる。

イゼーションを生じる場合は、この溶液は、支持体へのヌクレオチドプローブの非特異的結合を最小にするという付加的特性を有する。

4. 発明の要約

本発明は、寸法に従ってヌクレオチドマルチマーを選択的に吸着させるためにポリカチオン性固体支持体を使用することができ、マルチマーが大きいほうが小さいマルチマーよりも密接(強固)に支持体に結合するという発見に基づく。結合相互作用は少なくとも部分的には、正電荷を有する支持体とヌクレオチドマルチマーの負電荷を有する糖リン酸塩主鎖との間のイオン引力に基づくと考えられる。これらの特性はポリヌクレオチドを迅速に精製し且つそのハイブリッドを複合溶液から分離するためにバッチ法で使用され得る。

本発明のひとつの方法は、所望のマルチマーをポリカチオン性支持体に吸着させることにより、低分子量のマルチマーを含むマルチマーが得られる生物の各種の成分を含む溶液中でヌクレオチドマルチマーを精製することが可能である。臨床サンプルの場合、ヌクレオチドマルチマーはマルチマーを分離すべき体液及び組織の他の成分からも除去

支持体、及びポリヌクレオチドとのハイブリッドとして結合したヌクレオチドプローブは、傾倒、遠心分離又は浮過により溶液から分離され得る。粒子が磁性粒子の場合は、磁場分離が使用され得る。精製手順において、ヌクレオチドマルチマーは分離法を使用することにより固体支持体から回収され得る。プローブアッセイの場合、回収又は溶液中の標識の存在が決定され得、診断的意味を定性及び定量的に分析するために、サンプル中のポリヌクレオチドに含まれる標識核酸配列の存在及び量に関連付けられる。

本発明の全態様において、非ヌクレオチド物質からヌクレオチドマルチマーを分離し、その相対長さに基づいてヌクレオチドマルチマーの混合物を分離するための高度に選択的な方法が提供される。従って、本発明によると定性及び定量手順を含む多様な精製及びアッセイ手順が実施され得る。

5. 発明の詳細な説明

周知の核酸ハイブリダイゼーション法は、一重鎖ヌクレオチドマルチマーが適当な条件下で相補的なストランドに結合(ハイブリダイズ)する能力を利用している。本発明は、ヌクレオチドプローブとのハイブリッドを形成したポリヌ

クレオチドの存在を検出するための方法を提供する。本発明はまた、ヌクレオチドマルチマー及びそのハイブリッドの精製方法も提供する。

国際サンプル中でヌクレオチドマルチマーを精製又はポリヌクレオチドをハイブリダイゼーションするための方法は、分離を妨げると共にポリヌクレオチドの分解を助長し得るような生物汚染物がもたらす障害を克服しなければならない。例えばリボソームRNA(rRNA)の場合、rRNAが通常複合化するrRNAから各種のタンパク質を除去することが精製に必要である。更に、rRNAの分解を阻止するためには種々のヌクレアーゼ及び他の酵素を不活性化しなければならない。

ハイブリダイゼーションは一般に長い鎖的ポリヌクレオチド分子、即ち約100個以上のヌクレオチド(塩基)から構成される一重鎖DNA又はRNAを含む。鎖的DNA又はRNAに特定の塩基配列(鎖的配列)が存在するか否かを決定するためには、当業者に既知の各種の方法を使用してヌクレオチドアローブ分子を化学的に合成又は生物DNA又はRNAから単離する。ヌクレオチドアローブは鎖的の所望の塩基配列に相補的であり、一般に検出可能な化学種で標識されている、し

段では、ハイブリッドに固有のインターカラーター、ハイブリッドに特異的な抗体、高密度重量測定手段、電磁エネルギーの反射率の相違、又は電子検出を可能にする方法を使用することができる。当然のことながら、場合によってはハイブリダイズしていないアローブを測定することが望ましく、このような手順も本発明の範囲内である。

本発明の方法に従ってカチオン性支持体及び適当な分離溶液を使用すると、ポリヌクレオチド鎖的分子は支持体に結合するが、結合しなかったヌクレオチドアローブは支持体にあまり結合しない。この現象の厳密な理論的裏付けは完全には解明されておらず、発明者は特定の理論に結び付ける意図はないが、恐らく支持体表面上の電荷-電荷相互作用及びカチオン密度に関係があると考えられる。予想可能なメカニズムとして、温和な緩衝条件下では長いポリヌクレオチドの複合帯電領域は相互に協調してカチオン性固体支持体の表面への結合を助ける。一方、短いヌクレオチドアローブは同一多重度の電荷-電荷結合領域をもたないので、支持体との結合強度が弱い。なお、これらの支持体がオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドを包み込んで長いポリヌクレオチドと選択的に結合する能力は明白である。

かしながら、他の手段によりハイブリッドを検出できる場合には、ヌクレオチドアローブの標識は絶対的に必要ではない。典型的には、アローブは15~50個の塩基長のオリゴヌクレオチドであるが、数百の塩基長でもよい。鎖的塩基配列が存在する場合、ヌクレオチドアローブは塩基対合相互作用を通して鎖的に結合する。ハイブリダイゼーションが一旦完了すると、ハイブリッドは通常ハイブリダイズしていないヌクレオチドアローブ分子を含む溶液から分離される。しかしながら、用途によっては、例えば遠心分離又はポリヌクレオチドハイブリッドが吸着されている媒体から支持体を除去することなく固定化ハイブリッドを捕獲するような他の方法により、単に可溶相と不溶相とを分離すれば十分である。ハイブリッドをハイブリダイズしていないアローブから一旦分離したら、標準方法によりハイブリッドを検出する。直接標識法としては、放射性同位体、酵素、蛍光及び化学発光分子がある。それ自体では検出不可能な化学種を別の複合体に結合して検出する間接標識も知られている。間接標識の例としては、ストリプトビオジン及び酵素の複合体を使用するビオチン標識の検出が挙げられる。固定化ヌクレオチドアローブを必要としない他の検出手

このことは以下の実施例に明示され、本発明の方法が各種のポリヌクレオチド混合物の精製及び分離に特に適当であることを示している。従来技術とは異なり、本発明の方法は特にハイブリダイゼーション手順で、長さ及び電荷に基づいてヌクレオチドマルチマーを迅速に分離することが可能である。

リン酸主鎖に低い負の電荷を有する従来のDNA又はRNAのアナログをアローブとして使用することも本発明の範囲内である。このようなアナログとしてHiller他、*Biochemistry*, **25**, 5092 [1986]に記載のメチルホスホネートが挙げられる。

溶液中の相補的ヌクレオチドストランドを選択するために磁性微小球(磁気マイクロスフェア)と共有結合したヌクレオチドアローブを使用することについては複数の文献に示されている。しかしながら従来技術では、ヌクレオチドマルチマーが固体支持体に直接共有結合すると、ハイブリダイゼーションに必要な相補的ストランド間の適正な相互作用に望ましくない立体状態が生じ得ることが知られている(Life Technologies, "Immobilisation of Nucleic Acids" M085/ 04874 [10/24/85] 版)。この点に関する詳

細な開示はないが、Whiteheadにより記載されている方法は層間及びハイブリダイゼーションに不適当である。本発明は、分離を実施するためにイオン相互作用に訴えることにより共有結合の必要をなくす。即ち、本発明の特に好適な形態によると、ポリカチオン性表面を有する磁性微小球を使用して上記各種の手順のいずれかで溶液からヌクレオチドマルチマー及びそのハイブリッドを除去する。

本発明の方法は2つの主要要素を使用する。これらの要素とは、カチオン性固体支持体と、ヌクレオチドマルチマーを精製し、ヌクレオチドプローブとのハイブリッドの形成に基づいてポリヌクレオチド中の限定的配列をアッセイするための手順に関連する固定化、分離、洗浄、及び溶離段階を助長するために使用される数種の接触溶液の1種以上のことである。これらの溶液はポリヌクレオチドを固定化し、ポリヌクレオチドハイブリッドとヌクレオチドプローブとを分離し、固定化ポリヌクレオチド(ポリヌクレオチドとヌクレオチドプローブとのハイブリッドを含む)を洗浄し、固定化ポリヌクレオチド(ポリヌクレオチドとヌクレオチドプローブとのハイブリッドを含む)を溶離し、又はポリヌクレオチドとヌクレオチドプローブとの固定化ハ

イブリッドの存在に相関する検出可能な成分を溶離するために使用される。

カチオン性固体支持体の組成と接触溶液の組成との間には、接触溶液の組成が部分的にカチオン性固体支持体の組成により決定されるかあるいはその逆であるような相互作用が存在する。

更に、接触溶液の成分は方法の次段階で必要な組成を形成するために持ち越され、試薬を添加することにより修正され得るので、接触溶液の多くの間には緊密な関係がある。

これらの組成の使用を説明するためには、一般に以下の3つの使用範囲に分類することができる。

- I. ポリヌクレオチド又はヌクレオチドマルチマーの精製。
- II. ポリヌクレオチドの固定化とそれに続くハイブリダイゼーションであり、典型的には該ポリヌクレオチドに含まれる非反復ヌクレオチド配列を検出する。
- III. 溶液中に予め形成されたポリヌクレオチド及びヌクレオチドプローブのハイブリッドの分離及び検出。

これらの手順のうちのどれを実施したいかに応じて、異なる接触溶液の組み合わせが必要である。一般に、これらの手順の各々に有用な段階及び溶液は次のものであるが、

必ずしも1段階以上及び1種以上の溶液を使用する必要はない。

I. ニュクレオチドマルチマーの精製

- (1) 分離溶液の存在下で通常はポリヌクレオチドであるヌクレオチドマルチマーをカチオン性固体支持体に固定。
- (2) 洗浄溶液による汚染物の除去及びカチオン性固体支持体に固定化したマルチマーと溶液相との分離。
- (3) 溶離溶液を使用してカチオン性固体支持体の表面からマルチマーを回収。

II. ポリヌクレオチドの固定とそれに続くハイブリダイゼーション

- (1) 分離溶液の存在下でポリヌクレオチドをカチオン性固体支持体に固定。
- (2) 洗浄溶液により汚染物を除去(任意段階)。
- (3) ハイブリダイズしていないヌクレオチドプローブの固定化を最小にするように構成されたハイブリダイゼーション溶液中で固定化ポリヌクレオチドをヌクレオチドプローブと接触。
- (4) ハイブリダイズしていないヌクレオチドプローブの固定化を最小にする洗浄溶液を使用してハイブリダイズ

していないプローブを除去し、溶液相中でカチオン性支持体に固定化したハイブリッドを分離(任意段階)。

- (5) 溶離溶液によりハイブリッド又は固定化ハイブリッドの存在に相関する検出可能な成分の回収(任意段階)。
- (6) ハイブリッド、又はハイブリッドの存在もしくはハイブリダイズしていないヌクレオチドプローブに相関するハイブリッドに関連する検出可能な成分の検出。

III. 溶液中に形成されたハイブリッドの分離及び検出

- (1) ハイブリダイゼーション溶液の存在下でヌクレオチドプローブ及びヌクレオチドプローブに相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション。
- (2) ハイブリダイズしていないヌクレオチドプローブを適度に固定化させることなく、形成されたハイブリッドをカチオン性固体支持体に結合させるべく、ハイブリダイゼーション混合物をカチオン性固体支持体及び分離溶液に接触。
- (3) ハイブリダイズしていないヌクレオチドプローブの固定化を最小にする洗浄溶液を使用して、ハイブリダイズしていないプローブを除去(任意段階)。
- (4) 溶離溶液を使用して、ハイブリッド、又は固定化ハイ

ブリッドの存在に相関する検出可能な成分の回収(任
限障)。

- (5) ハイブリッド、又はハイブリッドの存在もしくは段階
(8)のハイブリダイズしていないヌクレオチドアロー
ブに相関する検出可能な成分の検出。

当業者には自明のように、このポリカチオン性支持体は、
直接結合、錯合及びアローブ置換アッセイを含む種々のアッ
セイフォーマットで使用することができる。また、既述は
直接でも間接でもよい。アローブ置換アッセイフォーマッ
トでは、ハイブリダイゼーションにより既述が結合相でな
く非結合相に現れる場合がある。以上の例は、ヌクレオチ
ドマルチマーを区別するためのカチオン性支持体のひとつ
の特徴を説明するものに過ぎない。本発明は特定のアッ
セイフォーマットに限定されるべきでない。

断りやすくするために、カチオン性固体支持体の組成及
び各種の接触溶液の組成に関して以下に本発明をより詳細
に説明する。もっとも、本発明の実施に先立って複製及び
アローブされるヌクレオチドマルチマーを濃縮させるため
にサンプル収集及びサンプル処理のような段階を実施する
ことは当業者に理解されよう。例えば、細胞溶解を実施す

スピード、又は直ちに既酸化された膜から精製され得るが、
本発明はこれらの材料に限定されるものではない。

支持体は適当な塩、洗浄剤及び温度の条件下で所望のポ
リヌクレオチドを吸着させるに十分な電荷密度を有するよ
うにカチオンで修飾された表面を有しているべきである。
電荷密度は経験的に決定される必要があるが、一般には支
持体 μg 当たり0.01~10マイクロ当量の範囲である。

電荷は非限定的な例として第一アミン、第二アミン、第
三アミン、第四アミンを含むアルキル及びアリールアミン
並びにグアニジン及びイミンのような範囲のカチオンによ
り導入され得る。

このような部分の例を挙げると、3-アミノプロピル基、
2-アミノエチル-2-アミノプロピル基、トリス(2-アミノエ
チル)アミン、スベルミン、スベルミジン、ペンタメチル-
2-アミノエチル-3-アミノプロピル基、及びアミン官能基
を有するポリマー(例えばポリリジン、ポリアルギニン、
ポリエチレンジアミン、及びポリアリールアミン)がある。

支持体の表面に通常存在している官能基は、カチオン性
官能基を含む試薬で容易に修飾され得る。ほぼあらゆるマ
トリックスの表面に官能基を導入するための多数の方法が当

る必要性及びそのための手順は当業者に周知であるので、
このような手順について説明することは本発明の詳細な説
明には不要であると される。

カチオン性固体支持体

本発明のポリカチオン性支持体マトリックスは多様な無機
及び有機材料から選択でき、非限定的な例として、金属酸
化物、ガラス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィ
ン、多糖類、ポリグリコール及びポリアミノ酸が挙げられ
る。要は、マトリックス支持体を使用される条件下で汚染物
及びヌクレオチドアローブのいずれも不当に吸着しないこ
とである。

好適な支持体は必要な材料の量を最小にするために高い
表面積対体積比を有する支持体である。このような比は、
粒子、特にミクロン寸法の粒子、アガロースのような多孔
度の高い材料、あるいは単独もしくはフィルターマットに
配置された小直径の繊維を使用することにより得られる。
小さいミクロン寸法の粒子を使用すると好適である。

以下の実施例において、マトリックスはWhitehead他、(U.
S.P.N. 4,554,088; Nov. 19, 1985)により記載されている
ような磁気反応性酸化鉄、ラテックス微小球、セファロー

業者に知られている。例えば、Porath及びAxen(Methods
in Enzymology, 44, 19-45, [1978])、及びGoldman他("Bio-
chemical Aspects of Reactions on Solid Supports", G.
R. Stark, ed., Academic Press [1971])を参照されたい。

一部において、カチオン性支持体の組成はその使用に
応じて経験的に決定される。固体支持体を調製するための典
型的なプロトコールがこれに続くが、他の同様の手順を使
用してもよい。単にヌクレオチドマルチマーの複製のため
にカチオン性固体支持体を使用する場合には、既述のマルチ
マーが0.6N未満の $\text{pH}=6.8$ のリン酸ナトリウムである緩衝
液中で支持体に結合する能力、及び20mMを超える $\text{pH}=6.8$
のリン酸ナトリウムに溶解する能力を試験する。ポリヌク
レオチドが0.6N未満の $\text{pH}=6.8$ のリン酸ナトリウムに結合
しない場合、カチオン密度を増加し、もしくは単一結合部
位のカチオンの多重度を増加させる(例えば3-アミノプロ
ピル基がトリス(2-アミノエチル)アミンに置換される)。
他方、ポリヌクレオチドが20mMを超える $\text{pH}=6.8$ のリン酸
ナトリウム緩衝液に溶解できない 合、カチオン密度を減
少し、もしくは単一結合部位のカチオンの多重度を減少さ
せる。

ヌクレオチドアローブからポリヌクレオチドハイブリッドを分離するために支持体を使用すべき場合は、ヌクレオチドアローブがハイブリッドを保持する条件下で過度に結合しないことが更に必要がある。これらの条件は、 $\text{pH} = 8.8$ のリン酸ナトリウム濃度が $20 \text{ mM} \sim 0.8 \text{ M}$ の範囲でポリヌクレオチド及びヌクレオチドアローブの結合を監視し、ポリヌクレオチド対ヌクレオチドアローブの最大結合比を与えるような緩衝液濃度を選択することにより試験され得る。満足できる結合比が得られない場合には、カチオンの表面密度及び多重度を更に修正する。

一般にポリヌクレオチド対ヌクレオチドアローブの長さの比は、通常は良好な分離のために3:1、好ましくは5:1より大きくすべきであることに留意されたい。もっとも、アローブ主鎖に低い負の電荷を有するDNA又はRNAアナログを使用するとこの基準を緩和することができる。しかしながら、アローブ置換及び融合アッセイでは、比を3:1にする必要がない場合もあり、実際にアローブ構成が低いよりも高い場合もある。

接触溶液

ポリカチオン性支持体の他に、分離溶液は特に重要であ

る組成であり得る。例えば、ヌクレアーゼ活性の阻害、ヌクレオチドアローブの結合の阻止、及びハイブリダイゼーション加速に関連する物質の影響の無効化を考慮すると、洗浄溶液と分離溶液の組成は同様であり得る。

接触溶液調製の第1段階は、カチオン性固体支持体の使用目的に依存する。次段階は接触溶液の調製である。一般に、調製用試薬は次のカテゴリーから選択される。

阻害: 酵素は部分的にヌクレアーゼを分解及び阻害し、タンパク質/核酸相互作用を中断させ、場合によっては固定化ハイブリッドに関連する疎離を切断するために使用される。これら酵素にはプロテアーゼ、ジエステラーゼ、ヌクレアーゼ及びペプタゲーズがある。

ヌクレアーゼ阻害剤: これらの剤はポリヌクレオチド分子及びヌクレオチドアローブの両者の分解を阻止するために使用される。その例としては、硫酸バナジル、バナジルリボシド及びRNAguard(米国NJ, Piscatawayに所在のPharmacia Fine Chemicals製ヒト胎盤リボヌクレアーゼ阻害剤の商標)のようなリボヌクレアーゼ阻害剤、デオキシリボヌクレアーゼ阻害剤、並びにドデシル硫酸ナトリウム及びラウリル硫酸リチウムのような洗浄剤が挙げられ、これらは

り、固定化を助長し且つヌクレオチドマルチマー及びそのアローブハイブリッドの分解を阻止するように注 深く調製すべきである。接触溶液には各種の緩衝液が含まれ、その濃度は所望の操作に依存して変化し得る。溶液の成分及びその濃度は、場合によって特に臨床サンプル中でヌクレアーゼを不活性化する必要、所望のポリヌクレオチド分離、及び分離後に必要な他の段階など多数の因子に依存する。例えば後で酵素検出を予定している場合には、内因性酵素活性からバックグラウンドをできるだけ少なくするために分離溶液の一部としてタンパク質変性剤又は阻害剤が必要であり得る。

先の段階から維持されている成分も考慮しなければならない。例えば、ほとんどの場合、分離は生物材料又はハイブリダイゼーション反応からポリヌクレオチドを除去することにより実施される。生物サンプルからポリヌクレオチドを遊離させるため又はハイブリダイゼーションを助長する(即ち加速度ハイブリダイゼーション)ために使用される各種の成分及び試薬は後の分離溶液の成分として維持される。

接触溶液は多くの共通成分を含み、場合によっては同一

一般的なタンパク質変性剤である。

キレート剤: これらの物質は非キレート化時に各種の酵素の活性に重要な各種の金属をキレート化するために使用される。例えば、多くのデオキシリボヌクレアーゼは活性のために Ca^{++} を必要とする。 Na^{+} のような金属はハイブリダイゼーションを妨げ得るので、ハイブリダイゼーション反応を最適化するためには金属イオンのキレート化も重要である。キレート剤としては、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)及びエチレンジアミンビス(2-アミノエチルエーテル)-N,N',N'-四酢酸(EGTA)がある。

洗浄剤: これらの物質は粒状材料を可溶化させ、ヌクレアーゼを阻害し、分離溶液及び洗浄溶液を使用してカチオン性固体支持体に固定化される汚染物及びヌクレオチドアローブを減少させるために使用される。洗浄剤はハイブリダイゼーション反応を加速するためにも使用され得る(加速系に関しては係属中の特許出願がある)。場合によっては混合ミセルを形成することにより第2の洗浄剤の影響を減らすために第1の洗浄剤を使用してもよい。洗浄剤のカテゴリーに含まれる物質には、ドデシル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸リチウム、N-ラウロイルサルコシン、ジソ

ブチルスルホ琥珀酸ナトリウム、Triton(登録商標)X-100、Brij(登録商標)、Tween(登録商標)-20及びTween(登録商標)-80がある(Triton、Brij及びTweenはICI Americanの登録商標である)。

緩衝液: これらの物質はヌクレオチドマルチマーの安定性、ハイブリッドの安定性及び標識として使用される剤の安定性に適合するpH範囲を維持するために使用される。これらの物質はカチオン性固体支持体上のハイブリッドの固定化と、分離溶液を使用する溶液中のヌクレオチドプローブの保持との間に基本的なバランスを得るためにも使用される。更に、これらの物質はハイブリダイゼーション溶液中に絮状物を形成するためにも使用される。各種の塩の濃度は支持体の表面からハイブリッド又はハイブリッドに関連するヌクレオチドプローブが溶解するのを助長するためにも使用され得る。このような物質としては、カリウム、ナトリウム、カルシウム、グアニジン、塩化物、フッ化物、硫酸塩、リン酸塩、酢酸塩、コハク酸塩、フィチン酸及びトリポリリン酸塩の塩がある。

有機溶媒: これらの溶液は各種の物質を乳化させ、ハイブリダイゼーション温度及び条件を変更させ、汚染物質を脱

去し、溶解溶液を使用してヌクレオチドプローブ及びハイブリッドの除去を助けるために使用される。このような有機溶媒としては、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、ホルムアミド及びジメチルホルムアミドがある。

他の有機及び無機物質: 所望の特性を与えるために各種の接触溶液中に他の物質を使用してもよい。これらの物質としては、酢酸、リン酸、フッ化水素、硫酸及び硝酸がある。また、無機物質は溶解溶液を使用してヌクレオチドプローブから標識を除去するために使用され得る。その例としては、過ヨウ素酸塩、酢酸鉛及び二酸化マンガンを挙げられる。

個々のケースで使用され得る個々の接触溶液は一般に次のように調合される。

ハイブリダイゼーション溶液: 一般に、緩衝液、洗浄剤、ヌクレアーゼ阻害剤及びキレート剤から調合される。組成はポリヌクレオチドとヌクレアーゼプローブとの間のハイブリダイゼーションを助長するように配合される。更に、ポリヌクレオチドがハイブリダイゼーションよりも前に固定化される場合は、ヌクレオチドプローブがカチオン性支

持体に過度に結合しないように組成を選択する。

分離溶液: ヌクレオチドプローブを過度に固定化させることなくハイブリッドを固定化させるべく、一般に緩衝液、洗浄剤及びヌクレアーゼ阻害剤から構成される。

洗浄液: 汚染物及びハイブリダイズしていないヌクレアーゼプローブを除去しながら固定化ハイブリッドを維持するように、一般に緩衝液及び洗浄剤から調合される。

溶解液: ポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドハイブリッド、ヌクレアーゼプローブ又はハイブリッドに関連する標識を支持体の表面から溶解させるように、一般に緩衝液、有機溶媒、洗浄剤及び他の試薬から構成される。

検出液: ハイブリッド又は特異的標識を検出するように個々に調合される。その組成は検出手段に依存し、従来技術の方法に従って調合される。例えば、標識が酵素の場合、検出溶液は選択された酵素基質及び他の試薬を含む。

以上の一般的な説明を一読した当業者は、以下の実施例を参考にすることにより、当業者の知識の範囲内で十分に特定の接触溶液の成分を多様な手順及び条件に適合させることが可能であろう。以下の実施例で使用される材料の出所を列 すると、磁性アミン微小球はAdvanced Magnetics,

Inc.(米国MA, Cambridge; Bioass M4100, 50mg/ml水溶液)から入手し、リゾチームは米国MO, St. Louisに所在のSigma社のGrade Iであり、尿素は米国ND, Bethesdaに所在のBethesda Research Labsの酵素グレードであり、RNAGuard(登録商標)(ヒト胎盤リボヌクレアーゼ阻害剤)は米国NJ, Piscatawayに所在のPharmacia社から入手し、Cytosine(登録商標)(液体シンチレーションカウンタール)は米国CA, San Diegoに所在のMettler社から入手し、ポリエチレングリコール8000は米国NY, Rochesterに所在のEastman-Kodak社から入手し、実施例7及び12で使用したスルホ琥珀酸ジイソブチル(DIBSS)は米国IN, Konaに所在のGen-Probe, Inc.の加速系(保真特許出願)であり、ヒドロキシアパタイト(HAP)及びZwittergent3-14は米国CA, La Jollaに所在のBehring-Diagnostics, Calbiochem Divisionから入手し、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)は米国MO, St. Louisに所在のSigma社から入手したTrizma-base(Tris)であり、Triton X-100は米国NY, Orangeburgに所在のFisher Diagnosticsから入手し、ストックは $[^3\text{H}]$ -rRNA(大腸菌リボソームの16S及び23Sサブユニット)とした。16SサブユニットのrRNAは約1500個の塩基長であり、23Sサブユニットは約

3000mm高長である。他の全試薬は試薬グレードとした。全リン酸緩衝液(PB)は、特に明記しない限りpH6.8のナトリウム塩とした。全操作は、特に明記しない限り容量1.5mlのねじ蓋式ポリプロピレン製超遠心分離管内で室温で実施した。

(以下余白)

実施例1

磁気アミンマイクロスフェアへのrRNAの結合

rRNAの結合に対する種々のバッファ濃度の影響を測定するために、5 μ lの磁気アミンマイクロスフェア、1 μ l(1 μ g)の[3 H]-rRNA及び100又は150 μ lの下記第1表に示した試薬を合せることにより分離用混合物を調製した。試薬には、完全アッセイのプロトコールに使用するかもしれず、rRNA結合に対するそれらの影響を研究されたものも含んでいる。混合物を2秒間軽く渦動させ、5~10分間放置した。BioMag Separator (Advanced Magnetics社、カタログ#M4101)を使って管の底に磁気マイクロスフェアをペレット化させ、上清(非結合)を除去した。次いで、結合が行われたバッファ100又は150 μ l中で磁気アミンマイクロスフェアを1~2秒渦動させることにより(1~2回)洗浄し、磁気により磁気アミンマイクロスフェアをペレット状にし、上清を除去した。次に、磁気アミンマイクロスフェアを100又は150 μ lの洗浄用バッファに再び懸濁させ、非結合及び洗液成分と同様に20mlのポリプロピレン管内の15mlのCytosclintに加えた。次に、Nuclear Chicago シンチレーションカウンタを使って、

各サンプル中のトリチウム量を測定した。

下記第1表に示すように、磁気アミンマイクロスフェアへの吸着によるrRNAの除去はバッファ濃度の変化に感受性であるが、完全アッセイのプロトコール中に存在するかも知れない他の試薬には余り影響されない。より重要なことには、試薬の濃度を変化させることにより、或いは溶液中に他の試薬を添加することにより、結合を減少させる試薬の作用を操作することができる。

第1表

試薬系	マイクロスフェアに結合した% [3 H]-rRNA
H ₂ O	94
50 mM PB	98
100 mM PB	98
140 mM PB	92
200 mM PB	89
300 mM PB	74
1 M NaCl	98
1 M NaCl + 50 mM PB	95

Tris, PEG 4/	89
蔗糖, リゾチーム 5/	99
8 M 尿素	74
4 M 尿素	97
1 % Triton X-100	100
5 % Triton X-100	47
1 % Zwittergent 3-14	98
5 % Zwittergent 3-14	78
2 M 尿素 + 1 M LiCl	73
10 mM EDTA (50 mM PB中)	88
500 U/ml RNA Guard TM	100
67% HOAc	37
50% HOAc	75
33% HOAc	79
20% HOAc	99
pH4 NaOAc 6/	95
18% DIBSS 7/	25
18% DIBSS, 50 mM PB	35
18% DIBSS,	

- 5% Triton X-100, 50 mM PB 80
 18% DIBSS, 1% SDS,
5% Triton X-100, 50 mM PB 80
 4/ 0.1 M Tris (pH 7.5), 1 M NaCl, 2.5 %
 ポリエチレングリコール
 5/ 7% 蔗糖, 0.08M グリシン (pH 9.0 w/NaOH),
 8 mM EDTA, 25 mM DTT, 2 mg/ml リゾチーム
 6/ w/5N NaOH で pH 4 に調整した HOAc, 最終
 HOAc 濃度 = 44%
 7/ wt: vol ジイソブチルスルホサクシネート

実施例 2

磁気アミンマイクロスフェアへの DNA の結合

本研究は、磁気アミンマイクロスフェアへの DNA の結合に
 対する種々のバッファ濃度及び他のアッセイ用試薬の影響を測
 定するために計画されたものであった。保存 rRNA の代りに、
 Mycoplasma pneumoniae 由来の rRNA に対する [^3H] -
 cDNA を使用する以外は実施例 1 の方法を用いた。cDNA
 は約 400 ~ 1600 塩基の大きさの cDNA の混合物であった。
 第 2 表に示すように、cDNA は rRNA とほぼ同様に磁気

アミンマイクロスフェアに結合し、結合の程度は他の試薬を添
 加すること並びにバッファ濃度を変化させることにより操作で
 きる。

第 2 表

試 薬 系	マイクロスフェアに結合 した% [^3H] - rRNA
H ₂ O	100
0.05M PB	100
0.10M PB	99
0.15M PB	99
18% DIBSS, 5% Triton	
X-100, 100mM PB	0
14.5% DIBSS, 3.75%	
Triton X-100, 75 mM PB	0
9% DIBSS, 2.5% Triton	
X-100, 50 mM PB	88
4% DIBSS, 5% Triton	
X-100, 50 mM PB	100

実施例 3

磁気アミンマイクロスフェアからの rRNA の溶解及びハイブ
リット形

この実施例では、[^3H] - rRNA を磁気アミンマイクロ
 フェアから溶解し、ハイブリッド形成させた。実施例 1 に記載
 と材料の他に、[^{32}P] - ATP は Amersham 社, Arlington
 Hts., IL, USA から、T4 ポリヌクレオチドキナーゼは
 Bethesda Research Labs. 社, Gaithersburg, MD,
 USA から入手した。

Applied Biosystems 社のモデル 380 A DNA 合成装置
 を使用してアローブを合成した。標準のホスホロアミグイト化
 学を用い、配列「5'-AGGACCGTTATAGTTAG
 GGCCGCCGT-3'」でデオキシオリゴヌクレオチドを
 製造した（この配列は大腸菌 (E. coli) リボソームの 23S サ
 ブユニットの塩基 1901 ~ 1926 に相補である）（アローブ配列に関
 し特許出願中）。次 Maxam 及び Gilbert の方法 (Proc. Natl.
 Acad. Sci. U. S. A., 74, 560 (1977) に従い、[^{32}P]
 - ATP 及び T4 ポリヌクレオチドキナーゼを使ってオリゴマ
 ーの 5' 末端を標識した。

[^3H] - rRNA の不動態化、溶解及びハイブリッド形成:

磁気アミンマイクロスフェア (50 mg/ml) 10 μg , 0.14M PB
 100 μg , 及び [^3H] - rRNA [1 mg/ml] 3 μg を合わせ
 ることにより [^3H] - rRNA を不動態化した。混合物を 1 ~
 2 秒軽く渦動させ、5 ~ 10 分放置した。磁気アミンマイクロ
 フェアを磁気的にベレット化し、(非結合) 上清を除去した。
 次に、磁気アミンマイクロスフェアを 0.14M PB 100 μg で
 1 回洗浄し、上清を除去した。

[^3H] - rRNA を溶解するために、磁気アミンマイクロ
 フェアに 50 μg の 0.6 M PB を加え、混合物を 1 ~ 2 秒渦動
 させた。5 μg を取り出し、放射活性を測定した（実施例 1 参
 照）。溶液の残りを 15 ~ 30 分室温に放置した。次に、磁気ア
 ミンマイクロスフェアを磁気的にベレット化し、上清の 5 μg
 のアリコートの放射活性を測定した。上清のもう 1 つのアリコ
 ートを取り、下記のハイブリッド形成用混合物中に入れた:
 0.6 M PB 中の溶解した [^3H] - rRNA 25 μg (1.1 pmoles),
 [^{32}P] - DNA アローブ 0.5 μg (.23 pmoles), 1% SDS
 1.5 μg 及び H₂O 4 μg , 全体で 31 μg の溶液となる。

(放射活性に基き) 同量の保存 [^3H] - rRNA を使用して
 対照のハイブリッド形成も実施した: 保 [^3H] - rRNA

1.8 μ l (1.18 μ mol), [32 P]-DNAアローブ0.5 μ l (0.23 μ mol) 1.0 M PB 14.8 μ l, 1% SDS 1.5 μ l, 及び H_2O 12.4 μ l、全体で31 μ lの溶液となる。

次に、ハイブリッド形成用混合物を50℃で3時間インキュベートした。7 μ lのポリアロピレンのシンチレーションバイアル中の2%のヒドロキシアパタイト(HAP)を含有する0.14MのPB 5 μ lに各混合物を加えた。15秒間渦動させた後、サンプルを50℃で5分間インキュベートした。次に、E.C. テーブルトップ臨用遠心機(Needham Hts., MA, U.S.A.)で2000 \times G、2分間遠心分離することにより、HAPをペレット化した。上清を除去し、0.14M PB 5 μ lを加え、混合物を15秒間渦動させた後、上述のように遠心分離した。上清を除去し、HAP、非結合物及び洗浄液のCerenkov [32 P]活性を測定して、ハイブリッド形成率、すなわち、HAPに結合した[32 P]値を有するアローブの割合を測定した。

支持体に結合した[3H]-rRNAの内80%が溶解された。溶解されたrRNA又は保存rRNAのいずれも、DNAアローブと反応させると31%でハイブリッド形成した。結果は、本発明方法によるポリヌクレオチドの精製が、更にハイブリッド

形成を行ったり、他の研究を行うためにはポリヌクレオチドを破壊しないことを示している。

実施例4

磁気アミンマイクロスフェアへの尿中rRNAの結合

この実験は、磁気アミンマイクロスフェアへのrRNAの結合に対する尿の影響を測定するために実施した。実施例3に記載の材料の他に、新鮮尿のサンプルを志願者から得た。

100 μ lの新鮮尿に、500 μ lの50 mM PB、8 Mの尿素又はpH4のHOAc (HOAc 1 μ l当り10N NaOHを0.28 μ lを加えて水酢酸をpH4に調整した)並びに保存[3H]-

rRNA 1 μ l (1 μ g)及び磁気アミンマイクロスフェア5 μ lを加えた。実施例1に記載したように混合物を処理したが、各々は50 mM PB 200 μ lで洗浄した。

結果から、核酸を遊離させ、蛋白質やヌクレアーゼを交性させるために生物学的サンプルと共に使用する尿素は、尿の存在下で[3H]-rRNAの結合を0.8%まで減少させることが示された。尿とリン酸バッファのみの中では、[3H]-rRNAの13%のみが支持体に結合した。pH4のHOAcとの組合せ中でのみ、100%のrRNAが磁気アミンマイクロスフェアに結

合した。

実施例5

(^{32}P 法)

磁気アミンマイクロスフェアへの、たんの中に溶解させた

rRNAの結合

より複雑な生物学的サンプル中で[3H]-rRNAを結合させるのに必要な試薬及びバッファの適切な組合せ及び濃度を決定するためにこの研究を行った。実施例4に記載の材料に加え、貯蔵した凍結したたん(各保存物は数例の患者からのたんを含んでいる)を種々の病院から入手した。

先ず、1/10容の0.5 Mジチオスウィート(DTT)を加えた後に渦動させ、22℃で10~15分間インキュベートすることにより、(使用の直前に)たんのサンプルを液体とした。次に、液体化したたんのアリコート100 μ lに、1 μ lの保存[3H]-rRNA (1 μ g)及び5 μ lの磁気アミンマイクロスフェアと共に種々の試薬を加えた。22℃で5分間インキュベーションした後、次に、サンプルを実施例1のように(但し、各々を50 mM PB 200 μ lで洗うことを除いて)処理して[3H]-rRNA結合の程度を測定した。結果を第3表にまとめ

第3表

磁気アミンマイクロスフェアによりたんから[3H]-rRNAを取り出すための試薬系

サンプル組成	最終濃度		磁気アミンマイクロ スフェアに結合した % [3H] - rRNA
	HOAc ^{8/}	尿素	
100 μ l たん + 100 μ l HOAc + 300 μ l 50 mM PB	20%	—	43
100 μ l たん + 100 μ l HOAc	50%	—	8
100 μ l たん + 256 μ l pH4 HOAc	58%	—	41
100 μ l たん + 256 μ l pH4 HOAc + 150 μ l 8 M 尿素	39%	2.4 M	50
100 μ l たん + 300 μ l HOAc / 尿素 ^{9/}	50%	4.0 M	81

8/ すなわち、部分的に中和したHOAc

9/ 840 μ lのpH4のHOAc (実施例4 照)と320 μ lの尿素を併せてHOAc / 尿素、pH5を調整した(最終容量=

1 ml, [尿素] = 5.33M, 66%部分中和したH₂OAc)

実施例6

たんから精製したrRNAのハイブリッド形成

この実施例では、たんから取り出し、支持体に結合した[³H]-rRNAを溶離して、本発明に使用する分離法がハイブリッド形成能を非常に減少させるかどうかを決めるための研究を行った。

配列「5'-GGCCGTTACCCACCTACTAGCTAAT-3'」(大腸菌[E. coli]の16Sリボソームの塩基235~260に相補)^{10/}を有するデオキシヌクレオチドアローブを合成し、実施例2に記載のように[³²P]で標識した。

10/ アローブ配列について特許出願中

磁気アミンマイクロスフェアにたん中の[³H]-rRNAを結合させ、非結合面分を除去(実施例5参照)した後に、1M NaCl, 50 mM PBで磁気アミンマイクロスフェアを1回洗浄した。上清を除去した後、0.8 M PB 50μlを加え、時々混合しながら混合物を22℃で30分間又は72℃で15分間インキュベートした。次に、磁気アミンマイクロスフェアを磁気的にペレット化し、上清のアリコートの放射活性と、インキュベ-

μl, 全体として11.41 μl。

次に、ハイブリッド形成用混合物を50℃で2時間インキュベートした後、実施例2に記載のようにHAP上のハイブリッドを単離した。標的が過剰な場合、保存rRNAと比べて溶離rRNAは67%のハイブリッド形成能を示した。アローブが過剰な場合には、保存rRNAと比べて溶離rRNAは65%のハイブリッド形成能を示した。

実施例7

磁気アミンマイクロスフェアを使用した、バッファ液からのRNA/DNAハイブリッドの回収

この実験は、溶液中で形成されたRNA/DNAハイブリッド用分離支持体としての磁気アミンマイクロスフェアを研究するために計画した。材料は実施例3に記載したものと同一である。更に、Legionella 特異性のDNAアローブ(平均100塩基の長さ)を使用した。

2つの異なる系で、RNA/DNAハイブリッドを分離する磁気アミンマイクロスフェアの能力を検討した。

系1: 保存[³H]-rRNA 8μl (5 pmoI), デオキシオリゴヌクレオチドアローブ1μl (.5 pmoI), 0.28M PB 10

μl (前記参照) 系の磁気アミンマイクロスフェアのアリコートの放射活性を比較して、溶離された[³H]-rRNAのパーセンテージを測定した。

標的過剰な場合とアローブ過剰な場合の両方で保存rRNAと溶離rRNAとのハイブリッド形成能を比較することによって、相補DNA-アローブ(材料参照)とハイブリッド形成する溶離[³H]-rRNAの能力を測定した。次のハイブリッド形成用混合物を調製した:

- (1) 0.8 M PB中の溶離rRNA 30μl (.44 pmoI), DNA-アローブ1μl (.07 pmoI), 1% SDS 4μl, H₂O 2.5μl, 全体で37.5μl。
- (2) 保存rRNA 0.7μl (.44 pmoI), 0.8 M PB 29.3μl, DNA-アローブ1μl (.07 pmoI), 1% SDS 4μl 及びH₂O 1.6μl, 全体で36.6μl。
- (3) 0.8 M PB中の溶離rRNA 9.35μl (.14 pmoI), DNA-アローブ1μl (.7 pmoI), 及び1% SDS 1.34μl, 全体として11.69 μl。
- (4) 保存rRNA 0.22μl (.14 pmoI), 0.8 M PB 9.13μl, DNA-アローブ1μl (.7 pmoI), 及び1% SDS 1.06

μl 及び1% SDS 1μlを合わせ、この混合物を50℃で1.5時間インキュベートすることによりRNA/DNAハイブリッドを形成した。更に、8μlの標的rRNAを8μlの水に置き換えた以外は、ハイブリッド混合物と同様に対照の混合物を作った。この対照混合物も50℃で1.5時間インキュベートした。各混合物の半量(10μl)を0.14M PB中の2% HAP 5mlに加え、実施例2に記載のように仕上げた。各混合物の他の半量を200 μlの0.14M PB+10μlの磁気アミンマイクロスフェアに加え、(洗浄用に0.14M PBを使用して)実施例1に記載のように仕上げた。

系2: Legionella rRNA 4μl (2.5 fmoI), Legionella アローブ2μl (1.3 fmoI) 及び44% DIBSS, 30 mM PB及び3% SDSを含むもの198 μlとを合わせてRNA/DNAハイブリッド混合物を製造した。4μlの標的rRNAを4μlの水に置き換える以外はハイブリッド混合物と同様に対照混合物を作った両方の混合物を72℃で2時間インキュベートした。各混合物のアリコート50μlを0.14M PB中の2% HAP 5mlに加え、72℃にし、2回洗浄を行うこと以外は実施例2に記載した通りに仕上げた。最終条件が、18%

DIBSS, 5% Triton X-100, 0.1 M PB及び10 μ lの磁気アミンマイクロスフェアを含有する全量150 μ lとなるように、分離用混合物に各混合物のもう一方の50 μ lを加えた。次に、72℃で、2回洗浄する(1回目の洗浄は18% DIBSS, 5% Triton 及び0.1 M PB; 2回目の洗浄は5% Triton, 0.1 M PB) 以外は実施例1に記載した通りに磁気アミンマイクロスフェアを仕上げた。結果を第4表に示す。

第4表

分離方法	結合%			
	系1	参照	系2	参照
HAP	53	1.5	30.3	0.4
磁気アミンマイクロスフェア	51	0.5	28.8	0.2

この結果は、磁気アミンマイクロスフェアは、ハイブリッド形成しなかったプローブを溶液中に残し、バッファ溶液からRNA/DNAハイブリッドを回収したことを示している。

実施例8

磁気アミンマイクロスフェアを用いた溶液からのDNA/

PB (HAP) 又は5% Triton, 45 mM PB (マイクロスフェア) でベレットを室温で1回洗浄した。次に、全ての面分を15mlのCytoscintに溶解し、前述のように放射活性を測定した。第5表の結果と実施例7の系2の結果とを好適に比較すると、ハイブリッドの結合は電荷依存性であり、標的がRNAであるかDNAであるかということには作用されないことを示している。

第5表

分離方法	結合%		正味%	
	ハイブリッド	参照	ハイブリッド形成	
HAP	33.9	1.1	32.6	
磁気アミンマイクロスフェア	36.1	1.4	31.7	

実施例9

磁気アミンマイクロスフェアに結合した核酸ハイブリッドに関連したオリゴヌクレオチドプローブを除去するための溶液バッファの調製

磁気アミンマイクロスフェアに結合したDNA/RNAハイブリッドに関連したオリゴヌクレオチドプローブを除去するため

DNAハイブリッドの回収

この実験は、溶液中で形成されたDNA/DNAハイブリッド用の分離支持体としての磁気~~アミン~~マイクロスフェアを研究するために実施した。実施例2に記載した材料の他に、実施例2に記載のcDNAの38-塩基領域に相補する合成の38-塩基デオキシオリゴヌクレオチドプローブを使用した。

実施例3に記載したように、オリゴヌクレオチドを[³²P]で標識した。cDNA標識20 μ l (約20fmol)、プローブ1 μ l (約60fmol) 並びに44% DIBSS, 30 mM PB及び3% SDSを含むもの200 μ lを合わせてDNA/DNAハイブリッド混合物を製造した。標識20 μ lを水20 μ lに置き換えること以外はハイブリッド混合物と同様にして対照混合物を製造した。両方の混合物を60℃で2時間インキュベートした。0.08 M PB中の2% HAP 450 μ l又は5% Triton, 45 mM PB 450 μ lのいずれかに磁気アミンマイクロスフェア10 μ lを加えたものに、各混合物のアリコート50 μ lを加えた。各分離用混合物を室温で5分間インキュベートし、前述の実施例に記載したようにHAP又はマイクロスフェアをベレット化し、上清を除去した。前述の実施例に記載したように、0.08 M

の種々の溶液バッファの力を次の方法で示した。

方法1: pH5の0.5 M PB中で[¹²⁵I]-標識デオキシオリゴヌクレオチドプローブ(標準法で調製)を標識RNAにハイブリッド形成させた(60℃で30分間、全容量30 μ l)。次に、1mlの0.25 M PB, pH5, 0.05% Triton X-100及び2.5 mgの磁気アミンマイクロスフェアを加え、渦動させ、そして60℃で5分間インキュベートした。球を0.25 M PB, pH5, 0.05% Triton X-100で2回洗浄した。磁気アミンマイクロスフェアのアリコート(5%) 100 μ lに加え、60℃で5分間インキュベートし、球から上清を分離し、 γ -カウンター (Isco - Data, Palatine, IL, USA, モデル20/20 DM) を使って各面分中に存在する[¹²⁵I]の量を測定することにより強力な溶剤を試験した。結果を第6表に全める。

第6表

溶 液	溶 剤	溶解率
0.25M PB, pH5, 0.01% SDS, 50%ホルムアルデヒド		95
3M NaOAc, pH5		95
0.25M PB, pH5, 0.01% SDS, 50% DMSO		85
0.1M NaOAc, pH5, 1% SDS, 1Mグアニジニウム-HCl		70

0.1M NaOAc, pH5, 1% SDS, 1Mプロピオン酸ナトリウム	68
0.1M NaOAc, pH5, 4% 0.01% SDS, 0.1M ピロリン酸ナトリウム	65
1Mクエン酸ナトリウム, pH5	60
0.25M PB, pH5, 5% SDS	58
0.1M NaOAc, pH5, 1% SDS 0.1M HgCl ₂	40

これらの結果は、広範囲の試薬がマイクロソフェアに結合したRNA/DNAハイブリッドから標識ヌクレオチドアローブを除去しうることを示した。

方法2: 他の溶離剤がアミン磁気マイクロソフェアに結合したDNA/RNAハイブリッドに関連した標識ヌクレオチドアローブを除去しうることを示すために、次のプロトコールを使用してこれらの強力な溶離試薬を試験した。

0.48M PB (pH5) / 0.1% SDS (全容量 150μl) 中、60℃で30分間、標的 rRNA に [³²P]-標識デオキシオリゴヌクレオチドアローブ (上述のように調製した) をハイブリッド形成させた。次に、0.15M PB (pH6.8) / 5.0% Triton X-100 1 ml 及びアミン磁気マイクロソフェア 2.5 ml を加え、渦動させ、60℃で5分間インキュベートした。0.3 M PB (pH

6.8) で3回マイクロソフェアを洗浄した。次に、アミン磁気マイクロソフェアに溶離溶液 300 μl を加え、60℃で5分間インキュベートし、球から上清を分離し、シンチレーションカウンター (Delta 300 Scintillation System, Searle Analytical 社, Des Plaines, IL, USA) を使って各画分中に存在する [³²P] 量を測定することにより、溶離試薬を試験した。結果を第7表に全める。

第 7 表

溶 離 剤	溶 離 率
0.05M フィチン酸, pH8.0	91%
0.05M トリポリホスフェート, pH8.0	87%
0.3 M PB (pH6.8) / 50%ホルムアミド	86%

これらの結果は、ポリホスフェートは磁気アミンマイクロソフェアから核酸を効率的に溶離しうることを示している。

実施例 10

固相ハイブリッド形成支持体としての磁気アミンマイクロソフェアの使用

この実験では、標的 rRNA を磁気アミンマイクロソフェアに結合させ、その後ハイブリッド形成させた。磁気アミンマイ

クロスフェア 5μl に、0.14M PB 100μl 及び保存 [³H]-rRNA 2μl (2μg, 1,200cpm) を加えた。材料は実施例 3 に記載したものと同一であった。混合物を 22℃で10分間インキュベートし、磁気アミンマイクロソフェアを磁気的にベレット化し、上清を除去した。磁気アミンマイクロソフェアに、0.14M PB 20μl 及びアローブ 0.5 μl (.23cpm) を加えた。対照として、保存 [³H]-rRNA 2μl, アローブ 0.5 μl 0.20M PB 5μl, 1% SDS 0.5μl 及び H₂O 2μl の溶液中でハイブリッドを形成した。次に、両方のハイブリッド形成混合物を 40℃で3時間インキュベートした。実施例 1 に記載のように、0.14M PB 100μl で磁気アミンマイクロソフェアを3回洗浄した。結果から、溶液中でのハイブリッド形成 (対照) が 20% であるのに比較して、不動化した rRNA の場合にはアローブのハイブリッド形成率は 5% であったことが示されている。

実施例 11

細胞溶解剤から核酸を精製するための磁気アミンマイクロソフェアの使用

この実験は、ハイブリッド形成能を顕著に減少させることをな

く粗サンプルから RNA を精製するために上述の磁気アミンマイクロソフェアを使用しうることを示すために実施した。

Legionella pneumophila 由来の rRNA を使って rRNA の精製法を研究した。材料は実施例に記載したものと同一であった。更に、Legionella 特異性アローブ及び Legionella pneumophila 生物をサンディエゴ, CA, USA から入手した。

水 30μl, Legionella pneumophila 懸濁液 (5 × 10⁸ 生物) 5μl 及び 24% SDS, .08M Tris-塩基, .08M EDTA 及び .08M EDTA 5μl を合わせた後、72℃で30分間インキュベートすることにより、細胞を溶解し、rRNA を放出させた。次に、下記のアッセイ用混合物を使用してサンプルの 4 分の 1 を直接 rRNA についてアッセイしたサンプル 10μl + 5.94M PB, 114 μl + DNA-アローブ¹¹ 1 μl + 水 75 μl。混合物を 72℃で30分間インキュベートし、HAP 結合ステップを 50℃で実施する代りに 72℃で実施すること以外は実施例 2 に記載したように HAP を使用してハイブリッド形成について分析した。サンプルのもう一方の 10μl に、HOAc / 尿素 (実施例 5 参照) 30μl を加え、混合物を 5 秒間渦動させ、磁気アミンマイクロソフェア 5μl を加え、混合物を (約 3 秒

間)軽く 動させた。22℃で5分間インキュベートした後、
 33℃で1 M NaCl, 50 mM PB 150μlで洗って洗
 し、結合した rRNAを0.6 M PB 50μlで 洗した(詳細
 は実施例2に記載)。次に、サンプル50μl, 5.94M PB 100
 μl, DNA-プローブ1μl及び水40μlを合せ、混合物を
 72℃で30分間インキュベートし、HAPを使用してハイブリ
 ッド形成を分析(実施例2参照)することにより溶解液を rRNA
 Aについてアッセイした。結果は第8表に全める。

第 8 表

直接アッセイ	30
マイクロソフェア精製、溶解、アッセイ	21
11/ 促進速度系について特許出願中	

実施例12

磁気アミンマイクロソフェアによるたんからの核酸の分離

この実験では、たんから *Legionella pneumophila* rRNA
 を精製し、前記 rRNAを洗ってハイブリッド形成させるため
 の磁気アミンマイクロソフェアの使用を示した。材料は実施例
 7のものと同じであった。実施例5に記載のように、貯蔵したた

実施例13

磁気アミンマイクロソフェア上でのハイブリッドの分離による *Legionella pneumophila*由来の rRNAの溶液中でのハイ ブリッド形成の促進^{12/}

この実験では、溶液中でのハイブリッド形成の促進と共にた
 んの中の *Legionella pneumophila* rRNAの検出への磁気ア
 ミンマイクロソフェアの使用を示した。貯蔵したたんの代りに
 各々のたんを使用すること以外は実施例11に記載したものと同
 じ材料を使用した。更に、5 mlのぬいぶた式の管をVanguard
 (スウェーデン)から; ガラスビーズ(0.2~0.3 ml)をGlen
 Millio社, Maywood, N J, U S Aから; 超音波清浄器を
 Branson Equipment 社, Shelton, CT, U S A (モデル
 1260)から; そしてCorning磁気セパレータラックをAdvanced
 Magnetics社(カタログ#M4700)から購入した。

貯蔵したたんについて実施例5に記載したように、各々のた
 んを液体化した。次に、0.1 ml中に 10^6 の生物を含むように、
 液体化したたんを*Legionella pneumophila*を接種した(実施
 例10 照)。5 mlの管にガラスビーズ(酸で洗ったもの)100
 μl 溶解バッファ(20% SDS, 10 mM EDTA, 10 mM

特表平1-502319 (21)

んのサンプルを液体化した。このたんのサンプルのアリコート
 30μl又は水のアリコート30μlに*Legionella pneumophila*
 懸濁液(5μl 当り 2×10^4 , 2×10^5 又は 2×10^6 細胞)5
 μlを加えた。実施例11に記載したと同じ方法を使用して、細
 胞を溶解させ、各サンプルの半量を直接ハイブリッド形成させ
 (ここではサンプル20μlと水85μlを使用した)。半量は磁
 気アミンマイクロソフェアを使用して rRNAを精製した後
 ハイブリッド形成させた(ここでは、サンプル20μlと
 HOAc/尿素80μlを使用した)。HAPを使用してハイブ
 リッド形成を分析した(実施例2参照)。結果を第9表に示す。

第 9 表

ハイブリッド形成率			
水	10^6	生物	42
	10^5	生物	33
	10^4	生物	5.9
たん	10^6	生物	67
	10^5	生物	13
	10^4	生物	2.6
バックグラウンド(生物なし)			1.2

EGTA, 50 mM Tris, pH8.0)100 μl及び接種したたん
 0.1 ml又は陰性の対照(0.1% SDS中1 mg/mlの子牛胸腺
 DNA)0.1 mlを加え、全て3つずつ作った。次に、サンプル
 を72℃で15分間超音波処理し、プローブ溶液(44% DIBSS,
 50 mM PB, pH6.8, 2 ml当りに10,000cpsの*Legionella*
 特異性DNAプローブ)を加え、混合物を満動させ、次いで72
 ℃で1時間インキュベートした。次に、以下の方法の1つによ
 りハイブリッドを分離した(全て3つずつ): 1. HAP, 遠
 心分離-各管に分離溶液(0.26M PB, pH6.8 中5%の
 HAP, .02% SDS)2 mlを加え、管を5回逆転させ、72℃
 で5分間インキュベートし、20回逆転させてから2000×で2
 分間遠心分離した。上清を静かに除去して捨て、4.5 mlの洗滌
 液(0.14M PB, pH6.8, .02% SDS)を加え、各管を20
 秒間満動させ、HAPをベレットして、上記のようにして上清
 を静かに捨てた。次に、Berthold ガンマカウンターで各管の
 放射活性を測定した。2. 磁気アミンマイクロソフェア, 遠
 心分離-各管に磁気分離溶液(9.5% Triton, 0.15M PB,
 pH6.8, 溶液2.75ml当り150 μlの磁気アミンマイクロソフェア)
 を加え、以下のことを除いては方法1に記載の通りに 管を処

理した：洗浄液は10% D I B S S, 5% Triton, 0.1 M PBであり；洗浄液 加後に、管を逆さにして磁気アミンマイクロスフェアを再び混合した。3. 磁気アミンマイクロスフェア、磁気分離- この方法は、遠心分離をCorning磁気セパレータラックを使用した磁気分離に代えたこと以外は、方法2と全く同じである。結果を第10表に示す。

第 10 表

結合したcpa %

方法	対照	ハイブリッド	ハイブリッド：対照
1	1.8	8.2	4.3
2	0.75	5.1	6.8
3	0.48	5.5	11.5

方法1 = H A P, 遠心分離、方法2 = 磁気アミンマイクロスフェア、遠心分離、方法3 = 磁気アミンマイクロスフェア、磁気分離。対照の値は、各々3回行った4つの別々の測定を平均を表わしている。ハイブリッドの値は、各々3回行った30の別々の測定（30の個々のたん）の平均を表わしている。

12/ 促進速度系について特許出願中

実施例14

他のポリカチオン性支持体を使用する本発明方法を更に研究するために磁気四級アンモニウムマイクロスフェアを合成した。磁気アミンマイクロスフェア（BioMag M 4100）はAldrich Chemical 社から購入した。インドメタンはAldrich Chemical 社、ミルウォーキー、W T, U S A から、2, 6-ルチジンはSigma Chemical 社、セントルイス, M O, U S A から購入した。他の材料は試薬級であった。

磁気アミンマイクロスフェア（250mg, 3.0 ml）を10mlの水に希釈した。マイクロスフェアを磁気的に分離し、50% (v/v) エタノール/水20mlに懸濁した後、磁気的に分離して洗浄した。この洗浄プロセスは20mlの無水エタノールを使って2回繰り返した。次に、洗浄したマイクロスフェアを20mlの無水エタノールに再懸濁した。攪拌しながら、インドメタン（250 μ l, 4 mmol）及び2, 6-ルチジン（24.5 μ l, 210 μ mol）を加えた；攪拌は室温で一晩続けた。次に、マイクロスフェアを磁気的に除去し、上述のように20mlの無水エタノールで4回洗浄し、5mlの水に再度懸濁させて4℃で保存した。

次に、溶液中のDNAオリゴヌクレオチドからRNAポリヌクレオチドを識別する支持体の能力を研究するために、規定の

rRNAを分離するための磁気プロピルアミンマイクロスフェアの使用

本発明方法は、支持体表面として、1つの型の磁気カチオン性マイクロスフェアの特性に限定されるものではなく、他のカチオンも包含することを示すために、磁気プロピルアミンマイクロスフェアを用いて規定のバッファから[^3H]-rRNAを除去した。マイクロスフェアがN-3-アミノプロピルシラン磁気マイクロスフェア（Advanced Magnetics社、特注品）であること以外は、実施例1に記載したものと同じ材料であった。

[^3H]-rRNAを除去するためにここで使用した方法は、磁気アミンマイクロスフェアの代りに磁気プロピルアミンマイクロスフェアを使用すること以外は、実施例1で使用したものと全く同じであった。140mM PB中では、93%のrRNAがマイクロスフェアに結合した。100mM PB + 1M NaClの溶液中では、83%が結合した。

実施例15

rRNAを分離するための磁気4級アンモニウムマイクロスフェアの使用

バッファから[^3H]-rRNA及び[^{32}P]デオキシオリゴヌクレオチドを除去するために磁気四級アミンマイクロスフェアを使用した。デオキシオリゴヌクレオチドは実施例8に記載のJenerであった。他の全材料は実施例1に記載のものと同じだった。

実施例1に記載の方法を使って結合を測定し、その結果を第11表に示す。

第 11 表

試 薬 系	[^3H]-rRNA 結合率	[^{32}P]-DNA 結合率
0.1M PB, pH5.7	99	—
0.1M PB, pH6.8	98	—
0.1M PB, pH7.8	96	—
0.1M BB ^{13/} , pH9.5	97	—
0.1M PB, pH6.8	98	82
0.15M PB, pH6.8	97	57
0.20M PB, pH6.8	97	39
0.30M PB, pH6.8	89	8

13/ BB = ホウ酸ナトリウムバッファ

実施例 16

rRNAを分離するための磁気ポリ-D-リジン官能基を有するマイクロスフェアの使用

実施例14及び15に上記したカチオン性誘導体の他に、ポリ-D-リジンを使って磁気マイクロスフェア誘導体化した。

材料：カルボキシル末端を有する磁気マイクロスフェアはAdvanced Magnetics社 (Biomag M4125、1g当り約 250u当量のカルボキシル基を含む) から購入した。88モノマー単位の平均重合化率を有するポリ-D-リジンはSigma Chemical社、セントルイス、MO、USAから入手した。N,N'-ジシクロヘキシルロカルボジイミド (DCC) はPierce Chemical社、ロックフォード、IL、USAからであり、N-ヒドロキシサクシニイミド (NHS) はEastman-Kodak社、ロチェスター、NY、USAからであった。

チフロン加工したねじばた式のガラスの試験管に、カルボキシル末端を有する磁気マイクロスフェアの20mg/mlの懸濁液10mlを移した。マイクロスフェアを磁気的に分離し、0.1N NaOH (10ml)、0.1M EDTA (10ml, pH7)、水(2×10ml)、5% ジオキサン/水 (10ml) 及び乾燥ジオキサン(8×10

[32P]-末端標識したオリゴヌクレオチドを得た。

ねじばた式の 1.5mlのポリプロピレン管に、ポリ-D-リジン官能基を有するマイクロスフェア(5μl)、パフファ(0.1Mリン酸ナトリウム、pH8.8 / 0.75 M NaCl、0.5ml)、及び [³²P]-rRNA溶液又は [³²P]オリゴヌクレオチド溶液のいずれかのアリコートを加えた。得られた懸濁液を10分間に亘り繰り返して渦動させることにより混合した。上清を磁気分離で除去し、シンチレーション液(5ml, BetagelTMカクテル)を含むバイアルに移した。次に、シンチレーション測定で放射活性を定量化した：

マイクロスフェアに結合した

[³²P]オリゴヌクレオチド： 0~8%

マイクロスフェアに結合した [³²P] rRNA： 75~82%

実施例 17

化学ルミネッセントな非アイソトープアッセイにおける磁気アミンマイクロスフェアの使用

非アイソトープアッセイ系用分離支持体として使用される磁気アミンマイクロスフェアの能力を示すために、化学ルミネッセントなアクリジニウムエステルで標識した合成デオキシオリゴ

特表平1-502319 (23)

ml)で順次洗浄した。次に、NHS (250mg) を含有する乾燥ジオキサン (10ml) 中にマイクロスフェアを再懸濁した。次に、DCC (400mg) を加え、遮光するためにホイルで試験管を覆った。15時間、上下に(end-over-end)回転させて懸濁液を混合した。磁気的分離後に、ジオキサン(8×10ml)、メタノール(8×10ml) 及び乾燥ジオキサン(8×10ml) で順次NHS-修飾マイクロスフェアを洗浄し、乾燥ジオキサン (10ml) に再懸濁した。得られたNHS-修飾マイクロスフェア懸濁液 1mlを磁気的に分離し、希塩酸水溶液 (pH4.3) で洗浄し、ポリ-D-リジン(7mg) を含有する 0.2M NaHCO₃ / 0.4M NaCl / 0.05% NaN₃ の溶液 0.5mlに再懸濁させた。2時間後、1MエタノールアミンHCl (pH8.4, 100μl) の溶液のアリコートを加え、非反応NHSエステル基におおいをした。マイクロスフェアを磁気的に分離し、水(2×1 ml) で洗い、水(0.5ml) に再懸濁させた。

ポリ-D-リジン官能基を有する磁気マイクロスフェアは、次のように、rRNAと合成オリゴヌクレオチド (28mer)との間の結合試験を行うことが示された：

(³²P)-標識した大腸菌 (*E. coli*) 由来の rRNA及び

ヌクレオチドプローブを使って形成したハイブリッドの分離を検討した。実施例1に挙げた材料の他に、Chlamydia trachomatis の rRNAに特異的なデオキシオリゴヌクレオチドプローブ (38-mer) を合成し、1987年10月2日にArnold らが出願した米国特許出願第 105,080号「ヌクレオチドプローブのアクリジニウムエステル標識及び精製」に記載されている通りに化学ルミネッセントなアクリジニウムエステル (AE) で標識した。Chlamydia trachomatis rRNAを使用し、アッセイ管は12×75mmのポリスチレン管であった。他の全成分は試薬級であった。

次の方法に従って、標的RNA (この場合、Chlamydia trachomatis)にAE-標識プローブをハイブリッド形成させた：ハイブリット形成用混合物

200μlのハイブリッド形成用パフファ(0.1Mコハク酸トリチウム、pH5.2、10%ドデシル硫酸ナトリウム、2mM EDTA、及び 2mM EGTA)、

1μlのRNA (10⁻⁸μg)、

1μlのAE-プローブ(0.125pmol)

対照混合物は、RNAの代わりに水を含有すること以外はハイ

ブリッド形成用混合物と同じであった。混合物を80℃で80分間インキュベートし、0.4M PB, pH8.0, 5% (v/v) Triton X-100, 3% (v/v) DIBSS及び2.5mgの磁気アミンマイクロスフェアを含む分離溶液2mlを加え、混合物を渦動させ、80℃で更に5分間インキュベートした。次に磁気アミンマイクロスフェアを磁氣的に管の端に引き寄せ、上清を静かに捨て、80℃に予め温めたpH8.0の0.4M PB 2mlで磁気アミンマイクロスフェアを3回洗浄した（洗浄用バッファを加え、渦動させ、磁氣的に分離し、静かに捨てる）。次に0.2M PB, pH8.0, 50%ホルムアミドを含有する溶離バッファ500μlを加え、渦動させ、80℃で2分間インキュベートすることにより、磁気アミンマイクロスフェアから結合プローブを溶離した。磁気アミンマイクロスフェアを磁氣的に管の端に引き寄せ、溶液を新しいアッセイ管に移した。次に0.25N HNO₃, 0.1% H₂O₂ 200μlを自動注入し、1秒後に1N NaOH 200μlを注入して、5秒間化学ルミネセンスを読む（結果は「相対光単位、又はrlu」で示される）ことにより、Berthold Clinilumat モデルLB 5502 (Wildbad, 西独)で、各サンプルの化学ルミネセンスを測定した。

A中に入れた（以下、これを単に「喉のスワブ」と呼ぶ）。次の方法に従って、AE-プローブを喉のスワブ物質中で少量のその標的rRNA（この場合、*Chlamydia trachomatis*）とハイブリッド形成させた。

50μlの喉のスワブ

6μlの4.8M PB (pH4.7)

2μlのAE-プローブ (1μgole)

2μlのRNA (3×10^{-3} , 3×10^{-2} , 3×10^{-1} μg)

対照の混合物はRNAの代りに水を含有していること以外はハイブリッド形成用混合物と同じであった。この混合物を80℃で80分間インキュベートし、次に実施例17に記載したように、各々の3分の1を分離し、洗浄し、溶離させた。

結果:

対 照	-	4.046rlu
10^{-3} μg rRNA	-	9.500rlu
10^{-2} μg rRNA	-	81.000rlu
10^{-1} μg rRNA	-	857.000rlu

これらの結果は、非アイソトープ標識を使用するアッセイ系で、臨床検体の存在下で、磁気アミンマイクロスフェアはハイ

結 果:

対 照 - 180rlu

10^{-3} μg rRNA - 8929rlu

これらの結果から、非アイソトープ標識を使用するアッセイ系において、磁気アミンマイクロスフェアはハイブリッド形成していないプローブからハイブリッド形成したものをはっきりと分離できることが示された。ここで、標的RNAが非常に低濃度 (10^{-3} μg) であっても、バックグラウンドは非常に低く（注入rluの0.01%未満）、信号が非常にはっきりしていることが判る。

実施例 18

臨床検体を用いる化学ルミネセントな非アイソトープアッセイにおける磁気アミンマイクロスフェアの使用

臨床検体の存在下での非アイソトープアッセイ系用分離支持体として使用される磁気アミンマイクロスフェアの能力を示すために、実施例17に記載のAE-プローブを使用して臨床検体中の標的rRNAの希釈系を抽出した。実施例17に挙げた材料の他に、喉のスワブ物質を志願者から得、3%ドデシル硫酸リチウム、80mM PB (pH8.8), 1mM EDTA及びEGT

ブリッド形成していないプローブからハイブリッド形成したものをはっきりと分離できることを示している。このサンプルではより大量のプローブを使用しているため、ここでは、対照が少なくとも部分的に実施例17のものよりも高い値を示している。

実施例 19

他のポリカチオン性支持体の合成

ハイブリッド分離におけるカチオン性支持体の使用を更に示すために次の支持体を合成した。

a) スペルミンラテックスマイクロスフェア

スペルミンではそのカチオンがポリヌクレオチドのアニオンに対応するように配置されているポリアミンであるために、本実施例ではスペルミンを選択した。ラテックスアミンマイクロスフェア（固体2.5%, 平均直径1μ, 0.125m当量/g）はPolysciences社、ワーリントン、PA, USAから購入した。1,4-ブタンジオール、ジグリシジルエーテル及びスペルミンはAldrich Chemical社、ミルウォーキー、WI, USAからのものであった。Millititer 86濾過ユニット及び0.22μのDurapore RフィルターはMillipore Filter社、ベッドフォード、MA, USAから贈呈された。他の全材料は試薬級で

あった。

まず、1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテルでマイクロスフェアを活性化した。25mg (1ml) のラテックスアミンマイクロスフェアを 0.22 μ の Durapore R フィルタ上で濾過した。次に、 NaBH_4 2mg/ml を含有する 0.6N NaOH 150 μ l にマイクロスフェアを再懸濁させ、スラリーをガラスの試験管に移し、ここに1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテル (150 μ l) を滴加させながらゆっくりと加えた。混合物を1時間と振り10分毎に軽く渦動させた後、水 1ml を加えた。次に、上述のようにマイクロスフェアを濾過し、水 (2ml) で洗浄した。

次に、活性化したマイクロスフェアをスベルミンと反応させた。上記反応からのエポキシド修飾マイクロスフェアを 0.1M Na_2CO_3 , pH:11.61ml に懸濁させ、混合しながら (50℃に温めた) スベルミン 75 μ l を加えた。室温で12時間反応させた後、マイクロスフェアを濾過し、水 (2ml) で洗浄し、水 (800 μ l) に再懸濁させた。

(b) トリス (2-アミノエチル) アミンラテックスマイクロスフェア (「トリス-ラテックス」) の合成

トリス (2-アミノエチル) アミンは Aldrich Chemical 社、

リス (pH8) 50ml で洗浄した。次に、誘導体化したゲルを15ml のねじ込み式の管に移し、4時間上下に回転させることにより 0.1 M トリス (pH8) 中で更に洗浄した。ゲルを濾過し、10ml の 0.1 M 酢酸ナトリウム (pH4) / 0.5M NaCl 、次いで10ml の 0.1M Tris (pH8) / 0.5 M NaCl で洗浄した。この洗浄サイクルを2回繰り返した。次に、保存用にゲルを 0.1M トリス (pH8) / 0.5M NaCl / 0.02 % アジドナトリウムに懸濁させた。

(d) トリス-(2-アミノエチル) アミンアクリルマイクロスフェア (「トリス-アクリルマイクロスフェア」) の合成

材料：トシル-活性化アクリルマイクロスフェアは Kirkgaard & Perry Labs 社, Gaithersburg, MD, USA から購入した (平均粒径 3 μ)。

ねじ込み式の 1.5ml ポリプロピレン管に、活性化マイクロスフェア (10% 懸濁液) 1ml を移した。Tomy-Seiko 微細遠心分離器 (モデル MR-15A, 東京, 日本) で5分間、10,000rpm で遠心分離してマイクロスフェアを分離し、上清を除去した。次に、0.1M NaHCO_3 (0.9ml) とトリス-(2-アミノエチル)

ミルウォーキー, WI, USA から購入した。この化合物ではそのカチオンがポリタクロオチドアニオンとほぼ同じだけ離れて配置されているので、この化合物を選択した。

本実施例の(a)に上述した方法に従って、トリス (2-アミノエチル) アミン (50 μ l) を活性化したマイクロスフェアに加えた。

(e) トリス (2-アミノエチル) アミンセファロース 4 B (「トリス-セファロース」) の合成

トレシルで活性化したセファロース 4 B は Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, スウェーデンから購入した。凍結乾燥したトレシル-活性化セファロース 4 B (1g) を、43分間と振り、1mM HCl (200ml) を使って、0.22 μ Durapore R (Millipore 社, ベッドフォード, MA, USA) フィルタ上で洗浄した。次に 0.1M NaHCO_3 (pH8) / 0.5 M NaCl 5ml とトリス (2-アミノエチル) アミン 200 μ l とを含む15ml のポリプロピレンのねじ込み式の管にゲルを移した。室温で2時間ゆっくりと上下に回転させることにより反応液を混合させた。濾過によりゲルを回収し、0.1M NaHCO_3 (pH8) / 0.5M NaCl 10ml、次いで 0.1M ト

アミン (0.1ml) を加え、渦動させることによりマイクロスフェアを再懸濁させた。管の内容物を18時間上下に回転させて混合した。アミン-修飾マイクロスフェアを遠心分離により除去し、水 (5 \times 1 ml) で洗い、0.02 % NaN_3 を含有する 20mM リン酸ナトリウム緩衝食塩水 (1ml) 中に再懸濁した。

(e) Tris-(2-アミノエチル) アミン及びポリ-D-リジンによる親水性のポリウレタンからなる膜の官能化 (「トリス-ポリウレタン膜」及び「ポリ-D-リジンポリウレタン膜」)

HP I 親和性膜 (親水性ポリウレタンベース) は Amicon 社, デンバー, MA, USA から入手した。この膜の大体の孔の大きさ及び厚さは各々 1.2ミクロン及び12,000分の1インチであった。2-フルオロ-1-メチルピリジニウムホスフェート (FMP) は Aldrich Chemical 社, ミルウォーキー, WI, USA から; ポリ-D-リジン (1分子当たり平均88モノマー) は Sigma Chemical 社, セントルイス, MO, USA から購入した。

T. T. Ngo, *Biotechnology*, **4**, 154 (1986) に報告された方法の変法により、膜上の利用しうるヒドロキシル基を FMP

Pで活性化した。1×1 cmの正方形の膜を15mlの平底のねじが
た式バイアルにし、乾燥アセトニトリルで2回洗浄した。次
に、再懸留したトリエチルアミン(80μg)を含有する乾燥ア
セトニトリル(4ml)にこの正方形を懸濁した。渦巻きさせなが
ら、トリエチルアミン(100μg)を含有する乾燥アセトニトリ
ル(10ml)中のFMP(200μg)溶液を滴加した。次に、バイ
アルの内容物を1時間回転台の上で渦巻きさせた後、溶液を除去
し、アセトニトリル(2×5 ml)、アセトン(5ml)、50:50アセ
トン/5 mM HCl水溶液(5ml)及び5 mM HCl水溶液(5
ml)で順次、膜片を洗浄した。次に、FMP活性化した膜の正
方形を2つのガラスのバイアルに分け、トリス-(2-アミノエチ
ル)アミン(100μg)又はポリ-D-リジン(50μg)のいづ
れかを含有する0.5M NaHCO₃ 5mlで処理した。各バイ
アルの内容物を回転台で15時間混合した。最後に、1M Na
Cl(3×5 ml)、0.1Mリン酸ナトリウムバッファpH7(3×5
ml)及び水(3×5 ml)で順次、アミン-誘導体化した膜の片を
洗浄し、次に、3MM紙(Whatman社、メイドストン、英国)
上で吸い取り乾燥させ、室温で乾燥した所に保存した。

実施例 20

[³H]-rRNA及び[³²P]-DNAの不動化：試験バ
ッファ0.5ml、スベルミラテックスマイクロスフェア20μg
及び[³H]-rRNA(14,000 CPM)又は[³²P]-DNAオリゴ
マー(15,000 CPM)のいずれか0.5μgを混合させ、50℃で5分
間インキュベートした。次に、Toy SokoモデルMR-15
A超高速心器(東京、日本)で2分間、18,000RPMで遠心分離
してマイクロスフェアをペレット化した。上清を除去し、20ml
のポリプロピレン管内のBetagelTM15mlに加えた。Nuclear
Chicagoシンチレーションカウンターを使って、各サンプル中
の[³H]又は[³²P]の量を測定した。

結果は第12表に示す。200mM~400 mM PBの濃度では、
スベルミラテックスマイクロスフェアは最大限に標的ポリヌ
クレオチドを除去し、最少限にプローブオリゴヌクレオチドと
結合した。より高いバッファ濃度の方がより優先的に選択され
た。

スベルミラテックスマイクロスフェアによる核酸の分離

実施例19に記載のように、スベルミラテックスマイクロ
スフェアを調製した。上述のように、保存[³H]-rRNAは大
腸菌(E. coli)由来のものであった。[-³²P] ATPは
NevEngland Nuclear Research Products社、ボストン、
MA, U.S.A. から; T4ポリヌクレオチドキナーゼは
Bethesda Research Labs社、Gaithersburg, MD,
U.S.A. から; BetagelTM(液体シンチレーション用カクテル)
はWostchoh, サンディエゴ, CAからであった。

プローブ合成及び標識: 標準のホスホルアミダイト化学14/
を使用し、Applied Biosystems社のモデル380A DNA合
成器(Forster市, CA, U.S.A.)を使って、「5'-GGCCGTAC
CCCACCTACTAGCTAAT-3'」の配列を持つデオキシヌクレオチドを
製造した(この配列は大腸菌(E. coli)リボソームの23cサ
ブユニットの塩基235~260に相補する)。Maxam及び
Gilbertの方法(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.
A., 74, 580 (1977))に従い、[-³²P] ATP及びT4-
ポリヌクレオチドキナーゼを使用してこのオリゴマーの5'-末
端を標識した。

第 12 表

スベルミラテックスマイクロスフェアに結合した
% [³H]-rRNA
スベルミラテックスマイクロスフェアに結合した
% [³²P]-DNA
オリゴマー

バッファ濃度	% [³ H]-rRNA	% [³² P]-DNA
10mM PB	98.0%	----
50mM PB	98.4%	95.7%
100mM PB	97.8%	92.9%
200mM PB	95.2%	41.2%
400mM PB	93.5%	8.5%
600mM PB	57.9%	----
800mM PB	76.5%	----

実施例 21

トリス-ラテックスマイクロスフェアによる核酸の分離

実施例19に上述したように、トリス-ラテックスマイクロ
スフェアを調製した。他の材料は実施例20に記載してある。

スベルミラテックスマイクロスフェアの代りにトリス-ラ
テックスマイクロスフェアを使用して、上述のように操作を

実施例 22

トリス-セファロースによる核酸の分離

実施例19に記載のようにしてトリス-セファロースを調製した。他の材料は実施例20に記載してある。0.5M PB 0.5ml 及び [^3H] -rRNA 又は [^{32}P] DNAオリゴマーのいずれか 0.5 μl にトリス-セファロース(100 μl) を加えた。内容物をしばしば渦巻させながら15分間80℃でインキュベートしてゲルを懸濁させた。18,000RPM で30秒遠心分離にかけてゲルをベレット化し、上清を除去して、BetagelTM15mlを含有する20mlのポリプロピレンバイアルに移した。ゲルを 0.5M PB 0.5 mlで2回洗った。洗液を遠心分離して分け、上述の BetagelTM含有ポリプロピレンバイアルに移した。最後に、ゲルを0.5 M PB 0.5 ml中に懸濁させ、同様に、BetagelTM15 ml含有のポリプロピレンバイアルに移した。上述のようにして、シンチレーション測定により各サンプル中の [^3H] 又は [^{32}P] 量を測定した。第14表の結果は、DNAオリゴヌクレオチドよりもRNAポリヌクレオチドにより結合することを示している。

行った。結果は第13表に示す。スベルミンラテックスによると同様に、トリス-ラテックスマイクロスフェアは、200~400 mM PBで最適にオリゴヌクレオチドからポリヌクレオチド極的に選択することを示した。

バッファ強度	第 13 表	
	トリス-ラテックス	トリス-ラテックス
	に結合した % [^3H] -rRNA	に結合した % [^{32}P] -DNA
10mM PB	92.0%	----
50mM PB	97.2%	64.6%
100mM PB	97.4%	69.4%
200mM PB	98.5%	18.5%
400mM PB	98.8%	8.3%
600mM PB	70.3%	----
800mM PB	79.4%	----

第 14 表	
サンプル	ゲルに結合するパーセント
[^3H] -rRNA	75.1 %
[^3H] -rRNA	80.6 %
[^{32}P] - DNA (28-ser)	0.34%
[^{32}P] - DNA (28-ser)	0.71%

実施例 23

トリス-アクリルマイクロスフェアによる核酸の分離

rRNAと合成オリゴヌクレオチドに対するトリス-(2-アミノエチル) アミン誘導体化したアクリルマイクロスフェア (実施例19に上述) の結合識別を示した。大腸菌 (*E. coli*) 由来の [^3H] -rRNA 及び [^{32}P] 末端標識オリゴヌクレオチド (28ser) は実施例20に記載してある。1.5mlのねじ込み式のポリプロピレン管に: トリス-(2-アミノエチル) アミン修飾マイクロスフェア懸濁液 (7 μl)、リン酸ナトリウムバッファ (pH8.8, 200 μl 、0.1~0.4Mの範囲)、及び [^3H]

rRNA 溶液又は [^{32}P] -標識オリゴヌクレオチド溶液のいずれか (1 μl) を加えた。懸濁液を50℃で10分間加熱し、次に

マイクロタイター連通マニホールド (0.22 μ の孔径, Millipore社, ベットフォード, MA, USA) のウェルに移した。真空にして、同じバッファ (200 μl) でフィルタ上でマイクロスフェアを洗浄した。真空を解除してからマイクロスフェアを20 mMのリン酸ナトリウム緩衝食塩水 (200 μl) に再懸濁させ、シンチレーションカクテル (10ml, BetagelTM) を含有するバイアルに移した。マイクロスフェアに結合した残存放射性をシンチレーション測定で定量化した。データを第15表に含める。

第 15 表

結 合 率		
バッファ	[^3H] -rRNA	[^{32}P] - DNAプローブ
0.1M PB	76%	18%
0.2M PB	71%	7%
0.3M PB	81%	6%
0.4M PB	47%	7%

実施例 24

ポリ-D-リジンポリウレタン膜及びトリス-ポリウレタン膜による核酸の分離

上記に既述の通り、実施例19上に上記したポリ-D-リジン修飾膜片は rRNA と合成オリゴヌクレオチド(10mer) に対し同様な結合選別を表すことが示された。

大腸菌 (*E. coli*) 由来の (^3H) -rRNA 及び (^{32}P) 末端標識オリゴヌクレオチド(10mer) を使用した。小穴を開けた吸い取り装置 (J. M. Specialty Parts, サンディエゴ, CA, USA) 中の3枚の 3MM 紙 (Waters 社, メイdston, 英国) の一番上に、アミン修飾した膜片を置いた。(^3H) -rRNA 又は (^{32}P) -標識オリゴヌクレオチドの $1\mu\text{g}$ アリコートをし、バッファ A (0.1M リン酸ナトリウム (pH8.8) / 0.15 M NaCl / 0.02% SDS / 0.1% Triton X-100) 又はバッファ B (0.1M リン酸ナトリウム (pH8.8) / 0.45 M NaCl / 0.02% SDS / 0.1% Triton X-100) いずれかの $200\mu\text{l}$ 中で希釈した。次に、小穴付き吸い取り器の適当なウェルに得られた溶液を入れ、毛管現象によりアミン修飾膜片を通過させた。次に小穴付き吸い取り器から膜を除去し、同じバッファ (バッファ A 又は バッファ B, $2 \times 2\text{ ml}$) で洗い、シンチレーションカクテル (BeigelTM) 5ml を含有するバイアルに移した。膜片に結合した放射性性をシンチレーション測定で定量化した。

ロスフェアを使用した。

(a) Mycoplasma pneumoniae の rRNA の領域に相補するピオチン標識 DNA オリゴマーの合成

材料: ピオチン- E -アミンカブロン N-ヒドロキシサクシニミドエステル (Biotin-X-NHS) は Calbiochem-Behring 社, サンディエゴ, CA, USA から購入した。5-アリールアミン UTP、末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ、及び 3' テイリング (tailing) バッファは Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD, USA の製品であった。Bio-Gel P-60 (100-100 メッシュ) は Bio-Rad Laboratories, リッチモンド, CA, USA から; Sephadex G-25 (中) は Pharmacia Fine Chemicals, ピスカタウェイ, NJ からのものであった。使用した他の材料は実施例19及び20に上述してある。Mycoplasma pneumoniae 由来 rRNA の 18S サブユニット中に存在する配列に相補の 38ヌクレオチド長のデオキシリボヌクレオチドプローブを使用した。実施例20に記載したように、このオリゴマー 5'-末端を標識した。

アリールアミン UTP による テイリング 反応: $50\mu\text{g}$ の 1×テ

結果を第16表に示す。

第 16 表

アミン修飾物	バッファ	結 合 率	
		(^3H) - (^{32}P) - DNA	
		RNA	プローブ
ポリ-D-リジン	A	49 %	1 %
ポリ-D-リジン	B	31 %	0.4 %
トリス-(2-アミノエチル) アミン	A	8 %	0.3 %
トリス-(2-アミノエチル) アミン	B	8 %	0.2 %

実施例 25

比色アッセイにおけるピオチン化 DNA-プローブと一輪のトリス-ラテックスマイクロスフェアの使用

比色ハイブリッド形成アッセイへの本発明方法の可能性を決定するために、Mycoplasma pneumoniae の rRNA に対するピオチン標識した DNA プローブと共にトリスラテックスマイク

ロッシングバッファ中、0.1mM アリールアミン UTP 及び 40 単位/μl の末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼと $9\mu\text{mol}$ の (^{32}P) -オリゴマーを 37°C で 1 時間反応させた。0.1M PB / 2mM EDTA で溶出する Bio-Gel P-60 カラム ($1 \times 10\text{cm}$) で、尾を付けたオリゴマーを精製した。次に、オリゴマーを Sephadex G-25 カラムに通し、0.2M 重炭酸トリエチルアンモニウム (TEAB, pH8) で溶出して脱塩させた。

ピオチン-X-NHS との反応: 60 分間隔で 4 回、0.1M NaHCO₃ (pH8.8) / 0.02% SDS $150\mu\text{g}$ 中に溶解したアリールアミン UTP の尾を持つオリゴマーを $10\mu\text{g}$ のピオチン-X-NHS (DMSO 中の 30mM 保存液) で処理した。0.1M PB / 2mM EDTA / 0.02% SDS で溶出する Sephadex G-25 ($0.7 \times 10\text{cm}$) カラムで、ピオチン化したオリゴマーを精製した。

(b) ピオチン化 DNA プローブ rRNA ハイブリッドの「トリス-ラテックス」上への不動化

Mycoplasma pneumoniae 由来 rRNA の保存液 ($1\mu\text{g} / \mu\text{l}$) を使用した。実施例19に記載のようにトリス-ラテックス懸濁液を調製した。他の材料は試薬級であった。

ハイブリッド形成用反応混合物は次のようであった：

ハイブリッド：rRNA 1 μ l (1 μ g)、ビオチニル化DNAプローブ10 μ l (0.1 μ mol)、1% SDS 0.4 μ l、1M PB 2.4 μ l、及びH₂O 8.2 μ l、全体として20 μ l。

プローブの対照：ビオチニル化DNAプローブ10 μ l (0.1 μ mol)、1% SDS 0.4 μ l、1M PB 2.4 μ l、及びH₂O 7.2 μ l、全体として20 μ l。

ハイブリッド形成用混合物を80℃で1時間インキュベートした後、トリス-ラテックス（水性懸濁液）10 μ l 及び 0.4M PB / 0.02 % SDS / 1.0% Triton X-100を加えた。内容物を混合し、80℃で5分間インキュベートした。13,000RPMで2分間遠心分離させて、トリス-ラテックスマイクロスフェアをペレット化した。Cerenkov 放射性を使ったシンチレーション測定により、マイクロスフェアに結合したままの [³²P] 量を測定した。

ハイブリッドの実験では、トリスラテックスには全放射活性の81%が結合している一方、プローブの対照では 5%しか結合していなかった。このことは、前の実験での58%のハイブリッド形成を反映している。

にサンプルを上述のように濾過し、（製造者の指示に従って、リン酸塩緩衝食塩水中で調製した）ストレプトアビジン-アルカリ性ホスファターゼ複合体 200 μ l 中に、濾過した固体を再懸濁させた。10分後に、サンプルを濾過し、0.1M Tris (pH7.5) / 0.1M NaCl / 8mM MgCl₂ / 0.05 % Tween-20 200 μ l で2回、次に 0.1M Tris (pH9.5) / 0.1M NaCl / 50mM MgCl₂ 200 μ l で1回洗浄した。次いで、0.83 μ g/ml (NBT) 及び0.17 μ g/ml (BCIP) を含有する 0.1M Tris (pH9.5) / 0.1M NaCl / 50mM MgCl₂ 200 μ l 中に濾過した固体を再懸濁させた。暗所で10分間発色させた。次に、濾過によりラテックス粒子を除去し、0.1M NaCl / 8mM MgCl₂ / 0.05 % Tween-20 で2回洗浄した。

約2分以内に、ハイブリッドサンプルについては、トリス-ラテックスマイクロスフェアの表面上に沈殿した水色の沈殿が認められた。これは、ビオチニル化プローブのみのサンプルについて観察された非常に薄い発色とははっきりと区別できた。

実施例 25

非アイソトープ比色アッセイにおけるビオチニル化プローブ

(c) ビオチニル化したDNAプローブ-rRNAハイブリッドはトリス-ラテックス上で非アイソトープ的に検出された

アビジン-アルカリ性ホスファターゼ複合体製造用試薬は Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A から購入した。牛血清アルブミン (BSA)、ニトロブルーテトラゾリン塩 (NBT)、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート (BCIP) 及び Tween-20 は Sigma Chemical 社、セントルイス, MO, U.S.A の製品であった。他の材料は実施例19及び20に記載した。

（本実施例中で上記したように、）ビオチニル化DNAプローブ / rRNA ハイブリッド又はビオチニル化DNAプローブのみのいずれかと共にインキュベートしたトリス-ラテックスの2つのサンプルを、Durapore R (Millipore社, Bedford, MA, U.S.A) フィルターを使用する Millititer 98 濾過装置で濾過した。0.1M Tris (pH7.5) / 0.1M NaCl / 8mM MgCl₂ / 0.05% Tween-20 中の 3% BSA 200 μ l 中に濾過固体の各サンプルを懸濁させ、1.5ml のおじ杓式のポリエチレン管に移し、44℃で1時間インキュベートした。次

と一緒のトリス-セファロースの使用

トリス-ラテックスマイクロスフェアの代りにトリス-セファロースゲルと共に実施例25のハイブリッド形成系を使用した。

(a) ハイブリッド形成させたビオチニル化プローブを Tris-Sephacross 上に不動化した

Icc のツベルクリンシリンジを使って、（実施例19に記載したように調製した）トリス-セファロースを 0.1ml 含有する小さいカラムを製造した。（実施例19に記載のように調製した）ハイブリッド形成用混合物を 0.25 M PB / 0.02 % SDS / 1.0% Triton X-100 0.5ml 中に溶解させ、5分間に亘ってトリス-セファロースカラムを通して一滴滴に通過させた。次に、0.5ml の同じバッファでカラムを洗った。実施例25(b)に記載のように、シンチレーション測定により、カラムに結合した残存 [³²P] 量を測定した。トリス-セファロースはプローブよりも特に正確にハイブリッドを選択することを示した。ハイブリッドの内、81%はトリス-セファロースに結合したが、プローブの対照は 0.8%しか結合しなかった。（プローブ対照に結合したままの [³²P] の量はバックグラウンド以上には測定できなかった。）。

(b) ビオチニル化プローブを非アイソトープ的に検出した

材は実施例21(e)に記載した通りであった。本実施例中に上述したように、トリス-セファロースの小さなカラムを調製し、ハイブリッド形成用反応混合物で処理した。次に、アビジン-アルカリ性ホスファターゼ複合体(0.5ml、実施例25(c)に記載したように調製する)をカラムに一滴ずつ通した。10分後に、軽く加圧して、残ったアビジン-アルカリ性ホスファターゼ溶液を押し出した。0.5mlの0.1Mトリス(pH7.5) / 0.1M NaCl / 3mM MgCl₂で2回、0.1Mトリス(pH9.5) / 0.1M NaCl / 50mM MgCl₂で1回ゲルを洗った。次に、NBT / BCIP染色試薬(0.5ml、実施例25参照)をゆっくりとゲルに通した。10分後に、残った試薬を押し出し、0.5mlの0.1Mトリス(pH7.5) / 0.1M NaCl / 3mM MgCl₂で2回ゲルを洗った。

約2分以内に、ハイブリッドサンプルについては水色の発色が認められた。これはプローブのみのサンプルとは容易に区別された。プローブのみのものでは、10分間発色させた後に、薄く青色になるだけだった。注：この支持体では、前の支持体(実施例25(c))で必要とされた8%BSAによる「キャッピング

(1μg, 1~0.0001μg)、4.8Mリン酸ナトリウムバッファ(2μg, pH6.8)、ドデシル硫酸ナトリウム(0.4μg, 1%溶液v/v)及び滅菌水(13.6μg)、全容量20μgを加えて、1.5mlのポリプロピレンの微細道心分離管中でハイブリッド形成反応カクテルを調製した。これらのカクテルを50℃で30分間ハイブリッド形成させた。次に、0.3Mリン酸ナトリウム(0.5ml, pH8.8)及びトリス-セファロース(約30μgの床容量)を加え、50℃の水浴中で10分間振とうすることにより内容物を混合させた。次に、管を微細道心器で軽く回転させ、パストゥールピペットで上清を排出させた。次に、0.3Mリン酸ナトリウムバッファ(3×0.5ml)、次に50mMトリスHCl(pH8) / 0.1M NaCl / 1mM MgCl₂ / 0.1mM ZnCl₂(2×0.5ml)で順次、トリス-セファロースペレットを洗浄した。次に、NBT(0.33mg/ml)及びBCIP(0.25mg/ml)を含有する0.1MトリスHCl(pH9.5) / 0.1M NaCl / 50mM MgCl₂の溶液300μg中にペレットを再懸濁させ、45℃で4時間インキュベートした。0.001μgまで少ない量的rRNAによるハイブリッド形成反応からのトリス-セファロースペレット上には青紫色の発色が認められた。最大限1.0

g)ステップは必要なかった。

実施例 27

比色アッセイにおけるアルカリ性ホスファターゼ標識DNA
プローブと一緒のトリス-セファロースの使用

実施例18に記載したカチオン性支持体は、アルカリ性ホスファターゼ/デオキシオリゴヌクレオチドプローブ複合体を使用する比色ハイブリッド形成アッセイにも使用できることを示した。

材料：E. JablonskiらがNucleic Acids Res., Vol.14, p.8115(1986)に記載した方法の改良により、大腸菌(E. coli)由来rRNA(以下に「標的rRNA」と呼ぶ)に相補の、アルカリ性ホスファターゼ標識合成オリゴヌクレオチド(26mer)を製造した。Candida albicans由来rRNA(以下、「非標的rRNA」と呼ぶ)との交差ハイブリッド形成が最少となるようにオリゴヌクレオチド配列を選択した。標的及び非標的rRNAを単離精製した。NBT及びBCIP染料は実施例25に上記した。他の材料は試薬級であった。

オリゴヌクレオチド-アルカリ性ホスファターゼ複合体(10μg, 1mol)、標的又は非標的rRNAのいずれかの希釈物

μgまでの非標的rRNAを有する対照からのトリス-セファロースペレットでは発色は全く認められなかった。

実施例 28

比色アッセイにおけるアルカリ性ホスファターゼ標識DNA
プローブと一緒のポリ-D-リジンポリウレタン膜の使用

この実験では、比色アッセイにおける分離支持体としてのカチオン膜の使用を示した。

実施例27に記載のようにハイブリッド形成反応を行った。この反応液に、300μgの希釈バッファ(0.1Mリン酸ナトリウム(pH8.8) / 0.45M NaCl / 0.02% SDS / 0.1% Triton X-100)を加えた。実施例24に記載の小穴の開いた吸い取り装置を使用し、毛細管作用により、得られた溶液をポリ-D-リジン膜片の間に通した。次に、膜片を小穴付き吸い取り器からとり除き、希釈バッファ(2×2ml)及びアッセイ用バッファ(2-アミノ-2-メチルプロパノールHCl(pH10.2) / 0.1M NaCl、2×4ml)で、洗浄した。次に、NBT(0.33mg/ml)及びBCIP(0.25mg/ml)を含有するアッセイ用バッファ(10ml)に膜片を浸した。10分後に、1μgの標的rRNAを含有するハイブリッド形成用反応液で処理した小穴

コルを使用した。細胞に対して冷凍および解凍のサイクルを3回行い、次に1mg/mlの自己消化プロナーゼ中37℃で10-60分間インキュベーションした。等容積の細胞和NaIを加え、溶液を20分間100°に加熱し、次いで連続希釈によりNaIを12.2重量モル濃度に変換し、ミニフォールド装置(シユライヒャーおよびシユエル)を用いNC膜において熱を通過させながら溶液のアリコートを通した。NC膜をH₂Oで湿らせ、次に5分間またはそれ以上6×SSCに浸し、1枚のセルロース紙上ミニフォールドに置いた。真空中溶液を引き込んでNCを通過させた。

その後、RNA膜を3交換のH₂O、次いで3交換の70エタノール/30H₂Oに浸して過剰のNaIを除去した。毎回約5分間室温で浸した。最後に、膜を室温で10分間無水酢酸溶液に浸し、塩基性蛋白質をアセチル化した。

上記の膜は直ちに分子ハイブリダイゼーションに使用され得た。フィルターを1ml/cm²(NC)のPR(0.9モルのNaCl、

を行った。

第1図は、固定実験から得られた典型的分子ハイブリダイゼーション結果を表す。mRNAまたはDNAは、正常なひとボランティアの血液から得られた単核細胞から固定されたものである。

さらに第1図の場合、核酸は本明細書記載の方法に従い固定された。mRNAおよびDNAは全細胞(R/D列)から固定された。RNAは、中央に向かって頂部、系統的な高希釈液から頂部4ドットに固定された。DNAは、中央に向かって底部、系統的な高希釈液から底部4ドットに固定された。mRNAもまた同細胞(C/N列)の細胞質および核分画から固定された。mRNAは、明細書記載の方法に従い調製された細胞質分画から頂部4ドットに固定された。希釈方向は中央に向かって頂部である。mRNAは明細書記載の方法に従い調製された核分画から底部4ドットに固定された。希釈方向は中央に向かって底部である。プレッサー等により(DNA)、2巻243-254頁、

0.09モルのNaCl、0.2%ポリビニルピロリドン、0.2%フィコル、1%NaドデシルS₂S、50μg/mlのポリ(A)、50μg/mlの低分子量DNAおよび10ミリモルのパナジルヌクレオシド)と共に「食物密封(seal-a-seal)」袋に密閉し、37℃で一晩振り混ぜた。PRを除去し、10°cph/mlの放射性プローブを含む0.1ml/cm²(NC)のHB(50%ホルムアミド、0.9モルのNaCl、0.09モルのNaCl、0.05モルのNa₂EDTA、1%のドデシル硫酸ナトリウム(NaDodSO₄), pH7.0)と置き換えた。袋を再密閉し、環境室温で装置中42℃で17-24時間振り混ぜた。ハイブリダイゼーション後、膜を除去し、30分交換で3回、PO(0.2%うし血清アルブミンを含むPR)と共に振り混ぜながら37℃でインキュベーションした。最後に、RNA-NCを60℃で15分間1%NaDodSO₄含有0.1×SSC中でインキュベーションし、-70℃でデュボン・クロマ・ハイスピード強化スクリーンおよびコダックBB5フィルムを用いてラジオオートグラフィー

(1983年)詳細に記載された50ホルムアミド・システムにおいて42°で10°cph/mlのニック翻訳mRNA置よう遺伝子プローブにより分子ハイブリダイゼーションを行った。-70°で20時間強化スクリーンを用いてラジオオートグラフィーを行った。

第1図を実行に移すため、4種の非希釈プレパラート(NaI中)を製造した。

- ・10°全細胞/mlから標準mRNA固定、
- ・10°全細胞/mlから標準DNA固定、
- ・相当量の10°細胞/mlから細胞質mRNA固定、
- ・相当量の10°細胞/mlから核mRNA固定。

これらのプレパラートの各々からNaI中4倍希釈物を調製し、次いで1080μlアリコートで第1図の説明に描かれた方向づけでNCによりろ過した。*P DNAプローブによるハイブリダイゼーションおよびラジオオートグラフィーを実施することにより、第1図に描かれた結果が得られた。R/D列

の結果は、平均して遺伝子1個当たり1分子未満のレベルでのmyc様遺伝子の発現を示し、C/N列はmRNA転写物の大部分が細胞質であることを示している。これらの結論は、固定されたmRNAおよびDNAが等しい効率でハイブリダイゼーションし(これはこれらの条件下では当然である)、全細胞が等しくmyc遺伝子を発現する(これは恐らく非現実的である)ことを仮定している。それにも拘わらず、myc遺伝子発現は正常な血液細胞の細胞質において検出され得る。

実施例2

「標準固定化」に関するデータ操作。

第2図は、白血病および骨髄増殖性疾患の患者および正常な対照から採取した血液細胞における約20個の遺伝子の発現を調べる大規模実験から得られた一般的结果を示す。mRNAおよびDNAを、第1図のR/D列に関して記載した方向づけを用いて単核血液細胞希釈物から固定した。24の同一R/D列を各細胞試料から製造した。フィルター製造後、それらを完全

23F図)または干渉性分子の共固定(co-immobilization)(第2E図)を評価した。時折、一次関係が1未満の比例定数により得られた。これは過剰の固定材料(不十分なプローブ)から生じたものであった。mRNA/DNAハイブリダイゼーション割合は、レファレンスとしてDNAを用い、遺伝子安定性を仮定する、遺伝子発現レベルの尺度である。

第2図の場合のような結果を用いることにより、ひと正常および白血病血液細胞における様々な遺伝子の発現レベルをmRNA/DNAハイブリダイゼーション・パラメーターを用いて計算した。これらの結果は、幾つかの種よう遺伝子および白血病血液細胞での幾つかの高度反復DNA配列の発現における2-10倍上昇を示した。

第3図および第4図は、レファレンスとして固定ポリ(A)含有物、未処理対照および他のmRNAを用いた、薬剤処置に応じた特定遺伝子の発現レベルにおける変化を示す。RT4ひとぼうこう癌細胞を24時間以下の間様々な薬剤に晒した。これ

に乾燥し、ジップ-ロック袋に冷蔵した。プローブが使用可能になると、フィルターをフィルター・バンクから抜き取り、分子ハイブリダイゼーションおよびラジオオートグラフィーにより分析した。次に、個々のドットを切断し、液体シンチレーションにより計数した。プローブ放射能を固定材料の量に対してプロットした($I = \text{約 } 5 \times 10^4$ 細胞からのmRNAまたはDNA)。所定量の細胞から固定されたmRNAに対するハイブリダイゼーション・シグナルを同数の細胞から固定されたDNAに対するハイブリダイゼーション・シグナルで割ることにより、mRNA/DNA分子ハイブリダイゼーション・パラメーターを得た。これは理論的には1遺伝子に対し製造されたmRNA分子の数である。

第2図により、mRNAまたはDNAの固定が行なわれる細胞数および分子ハイブリダイゼーション・シグナル間の関係を説明する。大部分の場合、予想通り、この関係は一次性であった。プローブの非特異的「背景」から生じる直線からの偏差値(第

らの細胞からのmRNAを反覆して固定し、様々な種よう遺伝子およびポリ(T)によりプローブし、後者を固定されたmRNAにおけるポリ(A)含有量の尺度とした。結果をラジオオートグラフィーにより表し(第3図)、次いで個々のドットを切断および計数し、結果を定量的に表した(第4図)。

第3図に進するために、RT4ひとぼうこう癌細胞を、薬剤の非存在下(C)、2、6または24時間薬剤1の存在下(I2、I6、I24)、24時間薬剤Aの存在下(A24)または24時間薬剤1およびAの組合わせの存在下(IA24)に成長させた。mRNAを 10^4 細胞および3つの4倍希釈物から固定し、高希釈物から低くなる順で並べた。I6のフィルターを製造し、50ホルムアミド中17時間sis様遺伝子(sis)、アブレソン白血病ウイルス様遺伝子(abl)、およびハーベイ肉腫ウイルス様遺伝子(ras-H)、キルステン肉腫ウイルス様遺伝子(ras-R)、およびモロニー肉腫ウイルス様遺伝子(mos)、ラス肉腫ウイルス様遺伝子(src)、ひとmyc様よ

第1頁の続き

⑫発明者	ネルソン, ノーマン・チャールズ	アメリカ合衆国、カリフォルニア・92111、サン・デイエゴ、マーレスタ・ドライブ・3639
⑬発明者	レノルズ, マーク・アラン	アメリカ合衆国、カリフォルニア・92037、ラ・ホーラ、イーブニング・ウェイ・3115-ジイー
⑭発明者	ウォールドロップ, アリグザンダー・エイ. ザ・サード	アメリカ合衆国、カリフォルニア・92123、サン・デイエゴ、ビリッジ・グレン・ドライブ・9249
⑮出願人	レノルズ, マーク・アラン	アメリカ合衆国、カリフォルニア・92037、ラ・ホーラ、イーブニング・ウェイ・3115-ジイー
⑯出願人	ウォールドロップ, アリグザンダー・エイ. ザ・サード	アメリカ合衆国、カリフォルニア・92123、サン・デイエゴ、ビリッジ・グレン・ドライブ・9249

を妨げないイオン性洗剤が存在することを含む請求項8の方法。

6. 段階(b)の後、固体支持体を洗浄する請求項1の方法。

7. 段階(b)の後、固体支持体を処理してポリヌクレオチドを回収する請求項1の方法。

8. 上記固体支持体を溶離液から分離してポリヌクレオチドを回収し、この溶離液を固体支持体から分離することを更に含む請求項1の方法。

9. 上記溶離液が、下記のものからなる群:

ホスフェート溶液

ピロホスフェート溶液

トリポリホスフェート溶液

フィチン酸溶液、及び

50%ホルムアミド溶液

から選択されたものである請求項8の方法。

10. 上記ポリヌクレオチドを上記溶離液から回収する請求項8の方法。

11. 生物学的試料が臨床検体である請求項1の方法。

12. 上記臨床検体が体液及び組織からなる群から選択されたものである請求項11の方法。

13. 上記臨床検体が尿検体、唾液検体及びスワブ検体からなる群から選択されたものである請求項11の方法。

14. 固体支持体が粒子からなることを特徴とする請求項1の方法。

15. 上記粒子が約1μmのサイズを有するものである請求項14の方法。

16. 上記粒子が磁界中を移動し、これによって磁石を用いた該粒子の溶液からの分離が可能となるのに十分な程度に、上記粒子が磁気で引き付けられるものである請求項14の方法。

17. 固体支持体が繊維からなるものである請求項1の方法。

18. 固体支持体が膜からなるものである請求項1の方法。

19. 固体支持体が、金属酸化物、ガラス、ラテックス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン、多糖、ポリグリコール及びポリアミノ酸からなる群から選ばれた材料から形成されたものである請求項1の方法。

イ。

25. 上記環境的条件が、上記ポリヌクレオチドが上記固体支持体に結合することを妨げないイオン性洗剤が存在することを含んでいる請求項22のアッセイ。

26. 上記生物学的試料が臨床検体である請求項20のアッセイ。

27. 上記臨床検体が体液及び組織からなる群から選択されたものである請求項26のアッセイ。

28. 上記臨床検体が尿検体、唾液検体及びスワブ検体から選択されたものである請求項26のアッセイ。

29. 上記固体支持体が粒子からなる請求項20のアッセイ。

30. 上記粒子が磁界中を移動し、これにより磁石を用いて粒子を溶液から分離することが可能となるのに十分な程度に、粒子が磁気で吸引されるものである、請求項29のアッセイ。

31. 上記固体支持体が、金属酸化物、ガラス、ラテックス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン、多糖、ポリグリコール及びポリアミノ酸からなる群から選択された材料で形成されたものである請求項20のアッセイ。

32. 上記オリゴヌクレオチドプローブがDNA又はRNAのアナログであって、該アナログがアルキルホスホネート及びアリールホスホネートからなる群から選ばれたものである請求項20のアッセイ。

33. 上記アナログがメチルホスホネートである請求項32のアッセイ。

34. 不純な生物学的試料中のポリヌクレオチド上に存在する標的配列を検出するためのアッセイであって、

(a) 上記生物学的試料を、オリゴヌクレオチドプローブであって上記標的配列とハイブリダイズし得るものと接触させてハイブリッドを形成する段階、

(b) 上記ハイブリッドを、アンモニウムイオン、インモニウムイオン、及びグアニジニウムイオンからなる群から選ばれたカチオンを複数有する固体支持体と、上記ハイブリッドは固体支持体に結合しハイブリダイズしなかったオリゴヌクレオチドプローブは固体支持体に結合しない様な環境的条件下で、接触させる段階、

20. 不純な生物学的試料中のポリヌクレオチド上に存在する標的ヌクレオチド配列を検出するためのアッセイであって、

(a) 上記生物学的試料を上記標的ヌクレオチド配列とハイブリダイズし得る標的オリゴヌクレオチドプローブと接触させてハイブリッドを形成する段階と、

(b) 上記ハイブリッドを、アンモニウムイオン、インモニウムイオン及びグアニジニウムイオンからなる群から選ばれたカチオンを複数有する固体支持体に、上記ハイブリッドは固体支持体に結合し結合相を形成するがハイブリダイズしていないオリゴヌクレオチドは固体支持体に結合せず遊離相を形成するような環境的条件下で接触させる段階と、

(c) 上記結合相又は上記遊離相中の標的を定量的又は定性的に測定することによって、上記標的ヌクレオチド配列を検出する段階とからなるアッセイ。

21. 上記の段階をバッチ法で行う請求項20のアッセイ。

22. 固体支持体が、

磁性アミン固体支持体、

磁性ポリアミン固体支持体、

磁性四級アンモニウム固体支持体、

磁性ポリ-D-リシン官能化固体支持体、

ポリ-D-リシン官能化ポリウレタン固体支持体、

スベルミンラテックス固体支持体、

トリス(2-アミノエチル)アミンラテックス固体支持体、

トリス(2-アミノエチル)アミンビーズ化アガロース固体支持体、

トリス(2-アミノエチル)アクリル固体支持体、

トリス(2-アミノエチル)ポリウレタンアミン固体支持体

からなる群から選ばれたものである請求項20のアッセイ。

23. 上記結合相を遊離相から分離し、結合相を洗浄する段階を更に含む請求項20のアッセイ。

24. 上記環境的条件が、上記ポリヌクレオチドが上記固体支持体に結合することを妨げないイオン性洗剤が存在することを含んでいる請求項20のアッセイ。

(c) 上記固体支持体をハイブリダイズしなかったオリゴヌクレオチドプローブから分離する段階、

(d) ハイブリッドとして上記固体支持体に結合した上記オリゴヌクレオチドプローブ、又はハイブリダイズしなかったオリゴヌクレオチドプローブを定量的又は定性的に測定することにより、上記標的配列の存在を検出する段階からなるアッセイ。

35. 上記ハイブリッド、標的化された上記オリゴヌクレオチドプローブ、又は標的化された上記オリゴヌクレオチドプローブからの標的を溶離液を用いて上記固体支持体から溶離し、溶離されたこれらのハイブリッド、標的化されたオリゴヌクレオチドプローブ又は標的を定量的又は定性的に測定することによって、上記固体支持体にハイブリッドとして結合した上記オリゴヌクレオチドプローブを検出する請求項34のアッセイ。

36. 上記溶離液が、50%ホルムアミド溶液、ホスフェート溶液、ピロホスフェート溶液、トリポリホスフェート溶液及びフィチン酸溶液からなる群から選ばれたものである請求項35のアッセイ。

37. 上記段階をバッチ方式で行う請求項34のアッセイ。

38. 上記固体支持体が、

磁性アミン固体支持体、

磁性プロピルアミン固体支持体、

磁性四級アンモニウム固体支持体、

磁性ポリ-D-リシン官能化固体支持体、

ポリ-D-リシン官能化ポリウレタン固体支持体、

スベルミンラテックス固体支持体、

トリス(2-アミノエチル)アミンラテックス固体支持体、

トリス(2-アミノエチル)アミンビーズ化アガロース固体支持体、

トリス(2-アミノエチル)アクリル固体支持体、及び

トリス(2-アミノエチル)ポリウレタンアミン固体支持体

からなる群から選ばれたものである請求項34のアッセイ。

39. 上記環境的条件が、上記ポリヌクレオチドが上記固体支持体に結合する

ことを防げないイオン性洗剤が存在することを示している請求項34のアッセイ。

40. 上記環境の条件が、上記ポリヌクレオチドが上記固体支持体に結合することを防げないイオン性洗剤が存在することを示している請求項38のアッセイ。

41. 上記生物学的試料が臨床検体である請求項34のアッセイ。

42. 上記臨床検体が体液及び組織からなる群から選ばれたものである請求項41のアッセイ。

43. 上記臨床検体が尿検体、喀痰検体及びスワブ検体からなる群から選ばれたものである請求項42のアッセイ。

44. 上記固体支持体が、粒子であって、溶液中でこれらの粒子が移動し、これにより磁石を用いて溶液から分離することが可能となるのに十分な強度に磁気で吸引されるものからなる、請求項34のアッセイ。

45. 上記固体支持体が、金属鹽化物、ガラス、ラテックス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン、多糖、ポリグリコール及びポリアミン酸からなる群から選択された材料で形成されたものである請求項34のアッセイ。

46. 上記オリゴヌクレオチドプローブがDNA又はRNAのアナログであり、該アナログがアルキルホスホネート及びアリールホスホネートからなる群から選ばれたものである請求項34のアッセイ。

47. 不純な生物学的試料中のポリヌクレオチド上に存在する標的ヌクレオチド配列を検出するためのアッセイであって、

(a) 上記生物学的試料を、アンモニウムイオン、インモニウムイオン及びグアニジニウムイオンからなる群から選択されたカチオンを複数含有する固体支持体に、上記ポリヌクレオチドは固体支持体に結合し結合ポリヌクレオチドを形成するが、上記ポリヌクレオチドよりも寸法の小さいオリゴヌクレオチドは固体支持体に結合しないような環境の条件下で接触させる段階と、

(b) 上記標的ヌクレオチド配列とハイブリダイズし得、ハイブリダイズしないときは上記固体支持体と結合しないような標識化オリゴヌクレオチドプローブを、上記結合ポリヌクレオチドに接触させ、上記固体支持体に結合したハイブリ

から選択されたものである請求項47のアッセイ。

52. 上記環境の条件が、ポリヌクレオチドが固体支持体と結合するのを防げないイオン性洗剤が存在させることを含む請求項47のアッセイ。

53. 上記環境の条件が、ポリヌクレオチドが上記固体支持体と結合するのを防げないイオン性洗剤が存在させることを含む請求項51のアッセイ。

54. 上記生物学的試料が臨床検体である請求項47のアッセイ。

55. 上記臨床検体が体液及び組織からなる群から選ばれたものである請求項54のアッセイ。

56. 上記臨床検体が尿検体、喀痰検体及びスワブ検体からなる群から選ばれたものである請求項55のアッセイ。

57. 上記固体支持体が、金属鹽化物、ガラス、ラテックス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン、多糖、ポリグリコール及びポリアミン酸からなる群から選択された材料で形成されたものである請求項47のアッセイ。

58. 上記固体支持体が、粒子であって、溶液中でこれらの粒子が移動し、これにより磁石を用いて溶液から分離することが可能となるのに十分な強度に磁気で吸引されるものからなる、請求項47のアッセイ。

59. 上記オリゴヌクレオチドプローブがDNA又はRNAのアナログであり、該アナログがアルキルホスホネート及びアリールホスホネートからなる群から選ばれたものである請求項47のアッセイ。

60. 不純な生物学的試料中のポリヌクレオチド上に存在し得る標的配列を検出するためのキットであって、

(a) 上記標識配列とハイブリッドを形成し得るオリゴヌクレオチドプローブ、及び

(b) アンモニウムイオン、インモニウムイオン及びグアニジニウムイオンからなる群から選択されたカチオンを複数含有する固体支持体であって、上記不純な生物学的試料中において、環境条件下で上記ハイブリッドは結合するが、上記オリゴヌクレオチドは結合しないような固体支持体、からなるキット。

61. 上記固体支持体が、下記のものからなる群：

ッドを形成し、

(c) 上記固体支持体をハイブリダイズしていないオリゴヌクレオチドプローブから分離し、

(d) ハイブリッドとして上記固体支持体に結合したオリゴヌクレオチドプローブ或いはハイブリダイズしていないオリゴヌクレオチドプローブを定量的或いは定性的に測定することによって、上記標的ヌクレオチド配列の存在を検出する段階と

からなるアッセイ。

48. 上記ハイブリッド、標識化された上記オリゴヌクレオチドプローブ又は、標識化された上記オリゴヌクレオチドプローブからの標識を溶解溶液を用いて上記固体支持体から分離し、溶解されたこれらのハイブリッド、標識化されたオリゴヌクレオチドプローブ又は標識を定量的又は定性的に測定することによって、上記固体支持体にハイブリッドとして結合した上記オリゴヌクレオチドプローブを検出する請求項47のアッセイ。

49. 上記溶解溶液が、50%ホルムアミド溶液、ホスフェート溶液、ピロホスフェート溶液、トリポリホスフェート溶液及びフィチン酸溶液からなる群から選ばれたものである請求項48のアッセイ。

50. 上記の段階をバッチ式で行う請求項47のアッセイ。

51. 上記固体支持体が、下記のものからなる群：

磁性アミン固体支持体、

磁性プロピルアミン固体支持体、

磁性四価アンモニウム固体支持体、

磁性ポリ-D-リシン官能化固体支持体、

ポリ-D-リシン官能化ポリウレタン固体支持体、

スベルミンラテックス固体支持体、

トリス(2-アミノエチル)アミンラテックス固体支持体、

トリス(2-アミノエチル)アミンビーズ化アガロース固体支持体、

トリス(2-アミノエチル)アクリル固体支持体、及び

トリス(2-アミノエチル)ポリウレタンアミン固体支持体。

磁性アミン固体支持体、

磁性プロピルアミン固体支持体、

磁性四価アンモニウム固体支持体、

磁性ポリ-D-リシン官能化固体支持体、

ポリ-D-リシン官能化ポリウレタン固体支持体、

スベルミンラテックス固体支持体、

トリス(2-アミノエチル)アミンラテックス固体支持体、

トリス(2-アミノエチル)アミンビーズ化アガロース固体支持体、

トリス(2-アミノエチル)アクリル固体支持体、及び

トリス(2-アミノエチル)ポリウレタンアミン固体支持体

から選択されたものである請求項60のキット。

62. 上記環境条件下において上記オリゴヌクレオチドが上記固体支持体と結合するのを防げないイオン性洗剤を更に含む請求項60のキット。

63. 上記固体支持体に結合したハイブリッドを溶解し得る溶解溶液を更に含む請求項60のキット。

64. 上記溶解溶液が、ホスフェート溶液、ピロホスフェート溶液、トリポリホスフェート溶液、フィチン酸溶液、及び50%ホルムアミド溶液からなる群から選択されたものである請求項63のキット。

65. 上記オリゴヌクレオチドプローブが検出に便利のように標識化されたものである請求項60のキット。

66. 上記オリゴヌクレオチドプローブがDNA又はRNAのアナログであり、該アナログがアルキルホスホネート及びアリールホスホネートからなる群から選ばれたものである請求項60のキット。

67. 固体支持体が粒子からなることを特徴とする請求項60のキット。

68. 上記粒子が約1μmのサイズを有するものである請求項67のキット。

69. 固体支持体が組織からなるものである請求項60のキット。

70. 固体支持体が膜からなるものである請求項60のキット。

71. 上記粒子が溶液中で移動し、これによって磁石を用いた該粒子の溶液からの分離が可能になるのに十分な強度に、上記粒子が磁気で引き付けられるもの

平成 7.12.20 発行

である請求項67のキット。

72. 上記固体支持体が、金属鹽化物、ガラス、ラテックス、ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン、多糖、ポリグリコール及びポリアミノ酸からなる群から選ばれた材料から形成されたものである請求項60のキット。